

Série A. N° 3612
N° d'ordre : 4485

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Hedwig JAKOB

1^{re} THÈSE — COMPATIBILITÉS, ANTAGONISMES ET ANTIBIOSES
ENTRE QUELQUES ALGUES DU SOL.

2^e THÈSE. — SYMBIOSE ENTRE ALGUES ET ANIMAUX.

Soutenues le 29 avril 1958, devant la Commission d'examen.

MM. L. PLANTEFOL..... *Président.*

M. CHADEFAUD.... } *Examineurs.*
J. FELDMANN }

PARIS
LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT
4, RUE DANTE, 4

1961



Digitized by the Internet Archive
in 2026

N° d'ordre : 4485

1961

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen..... M. J. PÉRÈS.

Professeurs

G. JULIA	T	Anal. sup. et alg. sup.	NORMANT... T	Chimie organique.
FOCH	T	Mécan. phys. et expér.	BENARD T	Chimie minérale.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.	BUVAT	T Botanique (E.N.S.).
PRENANT	T	Anat. et hist. comparées.	DUGUÉ	T Statist. mathématiques.
PÉRÈS	T	Mécan. des fluides et appl.	GELOSO	T Chimie (S.P.C.N.).
M. CURIE	T	Physique (S.P.C.N.).	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
BARRABÉ	T	Géol. struct. et appl.	ULRICH	T Physiologie végétale.
J. BOURCART	T	Géogr. phys. et géol. dyn.	MARÉCHAL	T Opt. théorique et appl.
PLANTÉFOL	T	Botanique.	KIRRMANN	T Théories chimiques.
GRASSE	T	Evol. des êtres organisé.	CHADEAUD	T Botanique.
PRÉVOST	T	Chimie organique.	DESTRIAU	T Physique (M.P.C.).
BOULIGAND	T	Appl. de l'anal. à la géom.	M ^{lle} LEBRETON T	Physiologie générale.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	SALEM	T Mathématiques génér.
WYART	T	Minéralogie.	LELONG	T Mathématiques génér.
TEISSIER	T	Zoologie.	DEVILLERS	T Anat. et histol. compar.
MANGENOT	T	Biologie végétale.	EHRESMANN	T Topologie algébrique.
P. AUGER	T	Phys. quantique et Relat.	FRANÇON	T Physique (S.P.C.N.).
MONNIER	T	Physiologie générale.	GLANGEAUD	T Géogr. phys. et géol. dyn.
PIVETEAU	T	Paléontologie.	GODEMENT	T Mathémat. (M.P.C.).
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).	PISOT	T Calc. des probabilités.
H. CARTAN	T	Mathémat. (E.N.S.).	E. ROCH	T Géologie.
LAFFITTE	T	Chimie générale.	SCHATZMANN	T Astrophysique.
FAYARD	T	Géométrie supérieure.	TERMIER	T Paléontol. stratigraph.
COULOMB	T	Physique du Globe.	ZAMANSKY	T Mathématiques générales.
Mlle COUSIN	T	Biol. animale (S.P.C.N.).	LENNUIER	T Physique (M.P.C.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.	RIZET	T Génétique.
P. DRACH	T	Zoologie.	ROUTHIER	T Géolog e appliquée.
KASTLER	T	Physique (E.N.S.).	M ^{me} TONNELAT T	Théories p ysiques.
EPHRUSSI	T	Génétique.	DIXMIER	T Mathémat. h(M.P.C.).
WURMSER	T	Biol. physico-chimique.	SOUCHAY	T Chimie générale.
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.).	AIGRAIN	T Electrotechnique.
GAUTHERET	T	Biol. végétale (P.C.B.).	BRUSSET	T Chimie minérale.
LUCAS	T	Recherches physiques.	M. LÉVY	T Physique théorique.
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.	Mme CHAIX	T Chimie biologique.
ARNULF	T	Optique appliquée.	Mme HUREL-PY	T Biologie vég. (P.C.B.).
M. MORAND	T	Enseign. de Physique.	PIAUX	T Chimie (P.C.B.).
SOLEILLET	T	Physique.	BRUN	T Méc. expér. des fluides.
FORTIER	T	Mécan. expér. des fluides.	LEDERER	T Chimie des subst. org. nat.
DANJON	T	Astronomie.	Mme DUBREIL T	Mathématiques.
LAPORTE	T	Phys. gén. et radio-act.	Mme LELONG T	Mathém. (E.N.S.).
JANET	T	Méc. anal. et Méc. céleste.	BELLAIR	T Géologie (S.P.C.N.).
PETIT	T	Biologie maritime.	COTTE	T Physique (M.P.C.).
QUENEY	T	Mét. et dyn. atmosphér.	DUBOIS J. E. T	T Chimie (S.P.C.N.).
GALLIEN	T	Embryologie.	LAMOTTE	T Zoologie (E.N.S.).
EICHHORN	T	Biologie vég. (S.P.C.N.).	LE ROLLAND	T Méc. des fluides.
DE CUGNAC	T	Biologie vég. (S.P.C.N.)	A. MICHEL	T Chimie (S.P.C.N.).
Mlle CAUCHOIS T	T	Chimie physique.	OLMER	T Energétique générale.
THELLIER	T	Physique du Globe.	ROUAULT	T Physique générale.
L'HÉRITIER	T	Génétique.	GAUTHIER	T Mécanique appliquée.
GRIVET	T	Radioélectricité.	BARCHEWITZ	T Chimie physique.
PONCIN	T	Mécanique générale.	BROSSEL	T Physique atomique.
DUBREIL	T	Arith. et théor. des nombr.	BUSER	T Biol. animale (P.C.B.).
QUELET	T	Chimie organique.	CAMUS	T Biol. végétale (P.C.B.).
CAGNIARD	T	Géophys. appliquée.	CASTAING	T Physique générale.
CHAMPETIER	T	Chimie macromolécül.	CURIEN	T Minéral. et cristallogr.
CUVILLIER	T	Géol. struct. et appliquée.	MOYSE	T Physiologie végétale.
JUNG	T	Pétrographie.	NOIROT	T Evol. des êtres organisés.
TRILLAT	T	Microsc. et diff. électron.	PANNETIER	T Chimie (S.P.C.N.).
WIEMANN	T	Chim. organ. structurale.	POSSIMPS	T Chimie anim. (P.C.B.).
JACQUINOT	T	Spectr. et phys. céleste.	PULLMANN	T Chimie théorique.
VASSY	T	Phys. de l'atmosphère.	TEILLAC	T Phys. nucléaire et radioac.
DESTOUCHES	T	Théories physiques.	TONNELAT	T Biol. physico-chimique.
M. PRUVOST	T	Géologie.	VILLE	T Econométrie.
AMIEL	T	Chimie générale (P.C.B.).	WILLEMART	T Chimie (P.C.B.).
HOCART	T	Minéralogie.	DODÉ	T Chimie.
J.-P. MATHIEU T	T	Physique (P.C.B.).	FREYMANN	T Physique (S.P.C.N.).
COUTEAUX	T	Biol. anim. (P.C.B.).	GUINOCHET	T Biologie végét. (Orsay).
MAY	T	Biol. anim. (P.C.B.).	ROLLET	T Chimie (P.C.B.).
CHOQUET	T	Calc. diff. et intégral.	Mlle JOSIEN	T Chimie (P.C.B.).
FELDMANN	T	Biologie (P.C.B.).	CHEVALLEY	T Géom. alg. et théor. d. gr.
GUINIER	T	Physique des solides.	ARNOULT	T Physique (Orsay).
JOST	T	Physiologie comparée.	CHAPELLE	T Physique (P.C.B.).
FORTET	T	Calc. des probabilités.	DELANGE	T Mathématiq. (Orsay).
SCHWARTZ	T	Calcul diff. et intégral.	DENY	T Mathématiq. (Orsay).
CHOUARD	T	Physiologie végétale.	GERMAIN	T Méc. th. des fluides.
MALAVARD	T	Aviation.	G. LUCAS	T Géologie.
BRELOT	T	Calcul différentiel.		

Secrétaire général C. MONIER



COMPATIBILITES, ANTAGONISMES ET ANTIBIOSES ENTRE QUELQUES ALGUES DU SOL

par Mlle **Hedwig JAKOB**

INTRODUCTION

Les phénomènes de concurrence et d'antagonisme dans les populations de microorganismes ont attiré l'attention dès le début de la microbiologie et ont suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. Un travail considérable a été accompli pour l'étude des substances antibiotiques produites par les Bactéries et par les Champignons du sol. Les algues, dont un très grand nombre d'espèces peuvent mener une vie terrestre n'ont été, jusqu'ici, que fort peu étudiées à ce point de vue. Les premières cultures pures ont été obtenues, dès 1890, par BELJERINCK : mais les travaux de physiologie, en particulier l'étude de leur métabolisme, n'ont suscité l'intérêt des chercheurs qu'assez récemment (BLINKS, MYERS, 1951). Au stade actuel des connaissances, il semble établi que les voies générales du métabolisme des Algues sont les mêmes que celles des autres organismes vivants. En outre, certaines d'entre elles sont capables de produire des antibiotiques, comme de nombreux Champignons et diverses Bactéries.

Il nous a paru intéressant d'examiner quelles sont les relations mutuelles entre différentes espèces d'Algues, en particulier dans les sols. L'étude des populations algales trouvées à tout moment, soit dans les collections d'eau naturelles, soit dans des cultures brutes d'échantillons du sol, indique qu'il existe toute une gamme d'interactions entre les différentes espèces d'Algues présentes. Comme pour les autres microorganismes, ces relations sont complexes. Elles peuvent être attribuées en partie à l'action de substances antibiotiques. La démonstration finale de la production, par une Algue, d'une substance inhibitrice pour d'autres organismes, ne peut être faite qu'en isolant la substance en jeu à l'état pur, et en démontrant qu'elle est réellement l'agent qui

provoque l'inhibition. Dans ce but, nous avons plus spécialement étudié les cultures d'une des Algues du sol, une Cyanophycée : *Nostoc muscorum*.

Il nous a paru intéressant d'examiner quels sont certains des mécanismes de l'activité biologique de cette substance, tant sur d'autres Algues que sur d'autres microorganismes. Bien que cette étude soit encore incomplète, nous rapporterons ici, les résultats que nous avons obtenus jusqu'à présent.

Monsieur Marcel LEFEVRE, m'a incitée à choisir les Algues comme matériel d'étude. Ces recherches ont été effectuées dans son laboratoire et je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour la bienveillance dont il a toujours fait preuve à mon égard.

Monsieur le Professeur L. PLANTEFOL me fait l'honneur de présider la soutenance de ma thèse. Qu'il veuille me permettre de lui exprimer ici ma respectueuse reconnaissance.

J'exprime aussi ma sincère gratitude à Monsieur le Professeur M. CHADEFAUD, pour l'intérêt qu'il a toujours porté à mes recherches, et pour tous les conseils et les encouragements qu'il m'a donnés au cours de ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur J. FELDMANN, qui m'a toujours témoigné une grande bienveillance et qui a bien voulu accepter de juger ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur E. LEDERER pour ses précieux conseils et l'aide qu'il m'a apportée pour l'exécution de la partie chimique de ce travail.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur B. EPHRUSSI pour m'avoir stimulée et encouragée pour la réalisation de ce travail.

Je remercie Madame L. GOLDSTEIN pour ses conseils et l'aide matérielle qu'elle m'a apportée au cours de mes recherches.

Je voudrais également remercier Mesdames LEFORT et BOISSONNET, techniciennes du laboratoire pour leur précieuse aide matérielle.

CHAPITRE PREMIER

RECHERCHES

SUR LES COMPATIBILITÉS, ANTAGONISMES ET ANTIBIOSES EN CULTURE ENTRE LES ALGUES DU SOL. SUBSTANCES ISSUES DU MÉTABOLISME DE QUELQUES-UNES DE CES ALGUES.

Les différents groupes d'organismes du sol ne vivent pas indépendamment les uns des autres mais forment plutôt un système en équilibre avec le milieu ambiant. Il existe apparemment pour chacun des organismes vivant dans le sol, une série de relations de symbiose et d'antibiose par rapport à ses voisins. L'examen des cultures d'Algues obtenues à partir d'échantillons de sol a pu nous fournir quelques indications sur ce genre de relations existant entre certaines espèces. Elles peuvent s'expliquer en admettant qu'elles sont dues à la présence dans le milieu de culture, de produits solubles de leur métabolisme. Il doit y avoir dans le voisinage immédiat d'une colonie algale et au fur et à mesure de sa croissance, diffusion de ces substances dans le milieu. Lorsque leur concentration devient suffisante elles peuvent entraîner soit l'inhibition de la croissance, soit même la mort d'autres Algues sensibles à leur action.

C'est la mise en évidence expérimentale de telles relations qui a fait l'objet de cette partie du travail.

I. — ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

Quelques travaux de ce genre ont été réalisés tant au laboratoire que dans la nature avec les Algues d'eau douce.

Bien que d'une façon générale, comme le dit MYERS (1951), les Algues puissent difficilement « subvenir au luxe inutile de l'excrétion » et que « la conservation du carbone et d'un niveau minimum d'excrétion soient la caractéristique générale des Algues vertes », des études plus détaillées ont montré qu'un grand nombre de ces organismes rejettent de faibles quantités de produits métaboliques extracellulaires dans le milieu de culture ; ceux-ci ne sont pas dus à l'autolyse ou à la décomposition des cellules, comme le pensaient KROGH et ses collaborateurs (1930), mais sont produits au contraire, par des cultures saines en voie de multiplication.

AKEHURST (1931), mentionne la présence dans les eaux chargées en Algues de produits d'excrétion de nature chimique inconnue, qui pourraient aussi servir secondairement d'aliments et inhiber ou stimuler la croissance d'autres organismes. L'analyse en a été faite pour certaines espèces de *Chlamydomonas* marins et d'eau douce, par BRAARUD et FOYN (1930) et LEWIN (1956), qui ont pu y mettre en évidence des polysaccharides. Par ailleurs ALLEN (1955) a détecté des polysaccharides et des acides organiques dans le cas d'autres espèces de *Chlamydomonas*, de même que TOLBERT (1955) pour *Chlorella*.

Pour d'autres groupes d'Algues, le niveau d'excrétion peut parfois être très important. L'étude de certaines Cyanophycées, en culture, a permis de montrer la libération de substances azotées en quantités appréciables, pouvant comporter jusqu'à 50% de l'azote assimilé. WATANABE (1951) a pu étudier la libération d'acides aminés par des cellules de *Calothrix* en voie de multiplication et FOGG (1952) a suivi avec beaucoup de minutie la libération de polypeptides dans le milieu de culture par *Anabaena cylindrica* et par d'autres Algues (FOGG et WESTLAKE 1953).

D'autres auteurs, LEFEVRE (1936), LESAGE (1945), avaient remarqué qu'en présence d'Algues les contaminations bactériennes et fongiques des cultures sont peu importantes. ENGLE et McMURTREY (1940) ont signalé une action favorable des Algues sur la croissance du riz, due à une diminution de la population de Champignons, qui résulterait de la présence de substances antifongiques produites par les Algues. En 1946, FLINT et MORELAND ont attiré brièvement l'attention sur la présence d'exsudats antibiotiques chez certaines Cyanophycées. Plus récemment des extraits d'Algues vertes ont été utilisés pour le traitement de certaines plaies chez les animaux (FELLER, 1948) et contre des maladies de la peau (KLOSA, 1949).

Une étude très détaillée sur la libération de « chlorelline », substance douée d'activité antibactérienne, produite par les cultures de *Chlorella* a été faite par PRATT et ses collaborateurs (1943-1948) ainsi que par SPOEHR (1949). Il en résulte qu'il s'agit d'acides gras non saturés, détectés également chez d'autres Végétaux. Ces mêmes acides gras seraient peut-être produits dans les cultures de *Chlamydomonas* étudiées par PROCTOR (1957).

Enfin, d'après VON DENFFER (1948), JORGENSEN (1956), et EMEIS (1956), une Diatomée, *Nitzschia palea* libère des substances à activité antibiotique, soit en culture, soit sur des filtres à eau.

Les Algues du sol ont été très peu étudiées à ce point de vue.

L'existence d'Algues dans les sols a été reconnue depuis fort longtemps et TREUB fut le premier en 1888 à leur attribuer une

certaine importance en tant que premiers êtres vivants à peupler des sols vierges. Mais c'est seulement vers 1910 que l'on a pensé que les Algues pouvaient être des représentants permanents de la flore du sol, et y jouer un rôle important. C'est à partir de cette époque que plusieurs auteurs, simultanément dans différents pays, ont commencé à étudier, surtout aux points de vue systématique et morphologique, la flore algale de divers sols (ROBBINS 1912 ; ESMARCH, 1914 ; SCHRAMM, 1914 ; FRANCÉ, 1921 ; MAGDEBURG, 1933). En 1922, FRITSCH publie une excellente revue des problèmes posés par l'étude des Algues du sol et à peu près à la même époque BRISTOL-ROACH (1919-1928) aborde l'étude de problèmes physiologiques posés par leur existence et en 1935 BOYE-PETERSEN donne les résultats d'une importante étude systématique et biologique des Algues trouvées dans différents sols du Danemark. Puis GISTL et SCHELLHORN (1932), FEHER et FRANK (1936-1939), FRITSCH (1936), STOKES (1940), JOHN (1942), WEINTRAUT (1943) et BRENDENMÜHL (1949) s'intéressent aux divers problèmes écologiques et physiologiques posés par l'existence des Algues dans les sols, souvent à des profondeurs considérables. WILSON et FOREST (1957), dans une brève étude écologique sur les Algues de certains sols du Canada, ont essayé de grouper en *associations* les Algues trouvées. VISCHER (1950) est le premier à introduire la notion de « Biotica » substances biologiquement actives excrétées par certaines Algues du sol pouvant exercer un effet favorable, ou au contraire inhibiteur, sur d'autres microorganismes se trouvant dans leur voisinage. Quelques essais expérimentaux lui ont permis de démontrer qu'en présence d'Algues, le développement du *Bacillus subtilis* est inhibé, mais l'importance de cet effet, dans le sol même, reste à déterminer. HARDER avait déjà observé, en 1917, la libération dans le milieu de culture de produits du métabolisme par des cultures de *Nostoc punctiforme*. Il fait remarquer que « lorsqu'on retourne les plaques de gélose ayant servi à la culture et qu'on les ensemeince à nouveau après les avoir arrosées de solution nutritive, la croissance est faible ». Il conclut à la présence dans la vieille culture de produits inhibiteurs de la croissance. Ceux-ci peuvent être détruits, d'après ses observations, par la lumière ou par l'ébullition.

HARDER et OPPERMAN (1953), ayant noté la rareté de la contamination bactérienne de leurs cultures d'Algues du sol ont pu démontrer la présence de substances bactériostatiques dans les milieux de culture de deux Algues isolées des sols : *Stichococcus bacillaris* et *Protosiphon botryoides*.

II. — MISE EN ÉVIDENCE D'INTERACTIONS ENTRE ESPÈCES ALGALES DU SOL

A. — INTERACTIONS DANS LES CULTURES SUR GÉLOSE.

L'étude des cultures sur milieu gélosé provenant d'ensemencements bruts d'échantillons de sols permet d'observer un certain nombre de relations topographiques entre espèces.

1° Plusieurs arrivent au voisinage l'une de l'autre puis s'imbriquent.

2° D'autres forment des plages qui présentent entre elles une étroite zone d'arrêt de croissance.

3° D'autres encore présentent entre elles une large zone d'arrêt de croissance, cet arrêt pouvant être létal pour l'une des deux espèces.

Il existe, en conséquence, des interactions différentes selon les espèces. Elles peuvent s'expliquer par la libération dans le milieu de culture de produits solubles de leur métabolisme doués de propriétés antibiotiques. Ceux-ci agissent sur les autres Algues, en particulier en inhibant leur développement.

L'isolement en cultures unialgales d'un grand nombre d'espèces à partir de cultures brutes d'échantillons de sol, puis leur remise en cohabitation a été effectuée pour permettre la mise en évidence expérimentale de ces interactions.

On ensemence simultanément, en différents points d'une même boîte de Pétri contenant du milieu gélosé, une goutte de chacune des espèces à éprouver et on observe, après croissance des Algues, les zones de contact entre elles. On peut classer les différentes espèces en 3 catégories :

a) Celles qui sont sans effet l'une sur l'autre :

Phormidium pachydermaticum et *Nostoc verrucosum*.

Phormidium pachydermaticum et *Nostoc Zetterstedtii*.

Nostoc gelatinosum, *Nostoc carneum* et *Nostoc Bornetii*.

Nostoc muscorum, *Nostoc verrucosum*, *Nostoc minutum* et *Nostoc paludosum*.

Nostoc muscorum, *Nostoc minutum* et *Phormidium autumnale*.
(Planche I, fig. 1 et 2).

Nostoc muscorum et *Cylindrospermum alatosporum*.

Nostoc muscorum et *Hormidium flaccidum*.

Hormidium flaccidum, *Tribonema aequale* et *Botrydium granulatum*.

b) Celles qui arrivent au voisinage l'une de l'autre mais en formant des zones d'arrêt de croissance :

Nostoc muscorum et *Chlorella pyrenoidosa*.

Mesotaenium caldariorum ensemencé dans la même boîte cohabite parfaitement avec les deux autres espèces.

c) Celles qui arrivent au voisinage l'une de l'autre en formant de larges zones d'arrêt de croissance avec mort de l'une des deux espèces :

Nostoc verrucosum et *Cylindrospermum alatosporum*.

Nostoc muscorum et *Phormidium uncinatum*.

Nostoc muscorum et *Cosmarium Lundellii* (Planche II, fig. 3 à 5).

Les zones d'inhibition, au point de rencontre de 2 espèces, ne sont pas dues à l'épuisement du milieu de culture en éléments nutritifs. En effet nous savons que toutes ces Algues peuvent parfaitement croître dans des milieux beaucoup plus pauvres que celui utilisé. En outre, si on dépose de fines gouttes de milieu nutritif neuf sur la surface de la gélose dans la région de contact, l'évolution des cultures reste la même.

B. — ACTION DE FILTRATS DE CULTURES UNIALGALES DE DIFFÉRENTES ESPÈCES D'ALGUES DU SOL SUR D'AUTRES ESPÈCES.

Les résultats obtenus en utilisant les filtrats de culture de différentes Algues sont consignés dans le tableau I. La classification des effets des différentes espèces est la même que pour les cultures sur gélose : on obtient soit un effet nul, soit une inhibition de croissance partielle ou totale pouvant être létale. On peut noter plusieurs Cyanophycées parmi les Algues exerçant un effet létal sur plusieurs autres espèces. L'une d'elles, *Nostoc muscorum* présente un assez large spectre d'activité. Nous l'avons étudiée avec plus de précision.

III. — ACTION DES FILTRATS DE CULTURES DE *NOSTOC MUSCORUM*

A. — SUR D'AUTRES ALGUES.

Les résultats obtenus avec les filtrats de deux cultures de *Nostoc muscorum* âgées respectivement de 6 (filtrat n° 1) et de 8 semaines (filtrat n° 2) sont résumés dans le tableau II.

On peut voir que ces filtrats sont :

1) *Sans effet* sur : *Phormidium autumnale*, *Phormidium rubro-terricola*, *Nostoc Bornetii*, *Nostoc verrucosum*, *Nostoc paludosum*, *Tribonema aequale*, *Mesotaenium caldariorum*.

2) *Faiblement actifs* pour la formation de cellules agglomérées ou d'anomalies de la morphologie sur : *Oscillatoria acutissima*,

Anabaena variabilis, *Hormidium flaccidum*, *Stichococcus bacillaris*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Pediastrum clathratum*.

3) Létaux pour : *Cosmarium Lundellii*, *Phormidium uncinatum*, *Euglena mutabilis*.

Ces résultats ont été retrouvés avec de nombreux autres filtrats de ce même *Nostoc*.

TABLEAU I

Action des filtrats de culture de diverses Algues sur quelques autres espèces.

Espèce ayant fourni le filtrat	Espèces introduites dans le filtrat : Aspect morphologique et développement			
	<i>Cosmarium Lundellii</i>	<i>Phormidium uncinatum</i>	<i>Pediastrum clathratum</i>	<i>Phormidium autumnale</i>
<i>Hormidium flaccidum</i>	Normal	Normal	Normal	Filaments enroulés
<i>Keratococcus subulosus</i>	Normal	—	Arrêt partiel de croissance	Normal
<i>Chlamydomonas Snowiae</i>	Normal	—	Normal	—
<i>Achnanthes plonensis</i>	Normal	Normal	Normal	—
<i>Anabaena variabilis</i>	Normal	Légèrement jaune	—	—
<i>Anabaena cylindrica</i>	Normal	Normal	Normal	Développe- ment peu abondant
<i>Cylindrospermum marchicum</i>	Normal	Normal	—	Normal
<i>Cylindrospermum alatosporum</i>	Normal	Normal	Normal	—
<i>Oscillatoria acutissima</i>	Normal	Normal	Normal	—
<i>Nostoc Zetterstedtii</i>	Quelques cellules mortes	Cellules gonflées	Mort	—
<i>Nostoc muscorum</i>	Mort	Mort	Faible croissance	Normal
<i>Nostoc paludosum</i>	Mort	Mort	Mort	—
<i>Nostoc calcicola</i>	Normal	Normal	—	

TABLEAU II

Spectre d'activité sur d'autres Algues des filtrats de *Nostoc muscorum*

Espèces introduites	Aspect morphologique et développement des espèces introduites		
	Témoin (I + C)	Filtrat N° 1	Filtrat N° 2
<i>Euglena mutabilis</i>	Normal	Toutes cellules mortes en extension	Toutes cellules mortes.
<i>Chlamydomonas Snowiae</i>	Normal	Toutes cellules mortes	Cellules agglomérées
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Normal	Cellules en mauvais état sur le fond	Mauvais développement
<i>Phormidium flaccidum</i>	Normal	Cellules rétractées	Cellules rétractées
<i>Pediastrum duplex clathratum</i>	Normal	Cellules déformées	Cellules déformées, gonflées
<i>Stichococcus bacillaris</i>	Normal	Normal	Normal
<i>Stigeoclonium tenue</i>	Normal	Mort	
<i>Tribonema aequale</i>	Normal	Normal	
<i>Cosmarium Lundellii</i>	Normal	Toutes cellules mortes. Contenu cellulaire rétracté	Toutes cellules mortes.
<i>Mesotaenium caldarium</i>	Normal	Normal	Normal
<i>Phormidium uncinatum</i>	Normal	Filaments à aspect anormal	Cellules mortes. Filaments gris.
<i>Phormidium autumnale</i>	Normal	Normal	Normal
<i>Phormidium rubrolericola</i>	Normal	Normal	Normal
<i>Oscillatoria acutissima</i>	Normal	Filaments agglomérés	Filaments agglomérés
<i>Anabaena variabilis</i>	Normal	Filaments agglomérés	Filaments agglomérés
<i>Nostoc verrucosum</i>	Normal	Normal	
<i>Nostoc paludosum</i>	Normal	Faible développement	
<i>Nostoc Bornetii</i>	Normal	Normal	Normal

B. — SUR LA MICROFLORE BACTÉRIENNE D'ÉCHANTILLONS D'UN SOL.

Les Bactéries ont été cultivées sur un milieu gélosé convenable pour leur croissance en présence de quantités variables de filtrats de *Nostoc muscorum*. Suivant les filtrats on observe soit un fort retard de croissance, soit une nette diminution du nombre total de colonies bactériennes. Les filtrats bruts de cultures de *Nostoc muscorum* présentent donc un large spectre d'activité tant sur les Bactéries que sur les Algues. C'est pourquoi cette espèce a été choisie pour la suite de ce travail.

CHAPITRE II

ETUDE SPÉCIALE DE L'ACTIVITÉ ANTIBIOTIQUE D'UNE DES ALGUES DU SOL : *NOSTOC MUSCORUM*

D'après ce qui précède, *Nostoc muscorum* est l'une des Algues du sol présentant une activité antibiotique énergique sur un grand nombre d'autres espèces algales et sur certaines Bactéries du sol. Elle libère, dans le milieu de culture, des excréments à propriétés antibiotiques. Le but de cette partie du travail était de préciser les conditions de leur production, leur nature chimique et d'étudier leur mode d'action biologique.

I. — LES CULTURES DE *NOSTOC MUSCORUM* MÉTHODES DE CULTURE.

ISOLEMENT EN CULTURE BACTÉRIOLOGIQUEMENT PURE

La première des difficultés de l'étude des excréments à propriétés antibiotiques était leur libération en quantités faibles dans le milieu de culture. Il fallait donc déterminer les conditions optimales de leur production.

J'ai choisi comme milieu de culture standard, un milieu synthétique, le milieu *Chu* préconisé pour la culture des Cyanophycées par GERLOFF (1950). Dans divers cas, d'autres milieux ont été utilisés. Leurs formules seront précisées plus loin, p. 20.

Le développement du *Nostoc* était le meilleur dans les fioles contenant un faible volume de liquide et présentant une grande surface d'aération. La production de substances extracellulaires était la plus importante dans ce cas. Les cultures ont été, en conséquence, effectuées surtout dans des flacons d'Erlenmeyer de grande capacité contenant 300 ou 350 cm³ de milieu.

Les expériences nécessitant un grand nombre de cultures simultanées, ont été effectuées dans des fioles de 150 cm³. Toutes les fioles étaient bouchées avec du coton et tous les milieux stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes avant emploi.

Les fioles étaient disposées sur des tables éclairées par des rampes de lampes à filament de tungstène, de 60 et de 200 watts, placées à 90 cm au-dessus des tables, donnant sur celles-ci un éclairage de 2200 Lux.

D'après les études d'ALLISON et de ses collaborateurs (1937) une interruption de l'éclairage, durant le nycthémère, est plus favorable à la croissance du *Nostoc* qu'un éclairage continu, quoique celui-ci continuellement appliqué soit toléré par les Cyanophycées, si son intensité est faible. Pour nos cultures, le temps d'éclairage a été de 17 heures sur 24, avec coupure entre 22 et 5 heures.

La température de la pièce était réglée de telle sorte qu'elle soit de $27^{\circ} \pm 1,5^{\circ}$ sur les tables. Cette température est favorable pour cette espèce d'après les travaux d'ALLISON et de ses collaborateurs (1937) et d'après KRATZ et MYERS (1955). Dans ces conditions, la croissance de la souche de *Nostoc* utilisée est satisfaisante.

Les ensemencements ont été faits, dans la majorité des cas, de façon à inoculer stérilement 5 cm^3 d'une culture en fin de croissance âgée de 6 à 8 semaines (milieu et cellules) dans les fioles d'Erlenmeyer de 3 litres contenant 350 cm^3 de milieu de culture. L'inoculat était proportionnellement plus faible pour les fioles de capacité moindre.

Nous mentionnerons plus loin quelques essais réalisés en faisant varier le volume ou l'âge des inoculats.

Les premières cultures dont nous nous sommes servie étaient simplement unialgales, mais non bactériologiquement pures. Pour la présente étude, il semblait particulièrement important de travailler avec des cultures, ne comportant pas de Bactéries parasites.

La difficulté de l'isolement des Cynaophycées en culture bactériologiquement pure a été déjà signalée par BEIJERINCK (1890) et DE (1939). En effet on transporte au cours des repiquages successifs les Bactéries qui vivent sur ou dans la gangue mucilagineuse de ces Algues. Il est pratiquement impossible de les en débarrasser par des moyens mécaniques.

Les premières cultures bactériologiquement pures de Cyanophycées ont sans doute été obtenues par PRINGHSEIM en 1913 et par ses élèves GLADE et MAERTENS, en 1914. Par la suite, un *Nostoc* a été isolé en culture pure par DREWES en 1928. Plus tard deux souches de *Nostoc muscorum*, utilisées pour l'étude de la fixation de l'azote atmosphérique par cette Algue, ont été obtenues bactériologiquement pures par ALLISON et MORRIS en 1930 et par GERLOFF et ses collaborateurs en 1950, en irradiant les cultures par des rayons ultraviolets, de longueur d'onde convenable, capables de tuer les Bactéries, mais non les cellules des Cyanophycées.

Nous avons utilisé, pour la purification de notre souche de *Nostoc*, la technique d'irradiation décrite par GERLOFF et ses collaborateurs, légèrement modifiée. Quelques filaments d'une

culture de *Nostoc* âgée de 3 semaines, sont introduits dans des tubes de quartz de 10 cm. de haut et de 1 cm. de diamètre, contenant 2 cm² de milieu *Chu*. Les tubes sont exposés à l'action d'une lampe bactéricide, donnant une radiation ultraviolette de 2750Å. Les tubes exposés sont retirés à des intervalles de temps variant de 5 minutes en 5 minutes, pendant 30 minutes.

Les épreuves de pureté bactériologique ont été effectuées sur milieux au caséinate de sodium, eau peptonée, bouillon nutritif et le milieu de BREWER pour Anaérobies. Par la suite, le contrôle bactériologique de routine des cultures n'a été fait que dans le milieu au caséinate de sodium.

Deux des tubes ayant subi respectivement une irradiation aux rayons ultra-violets de 20 et 25 minutes ne contenaient plus de Bactéries. La croissance et l'aspect morphologique des Algues qu'ils contenaient étaient normaux. Ce sont ces cultures qui ont servi pour la suite de ce travail.

II. — DESCRIPTION DU *NOSTOC MUSCORUM* ET ÉTUDE DE SON CYCLE DE DÉVELOPPEMENT

Les Algues du genre *Nostoc* sont des Cyanophycées appartenant à la famille des Nostocaceae. D'après FORTI (1907), ce nom viendrait du mot grec « nostos » qui signifie « retour » et il ferait allusion à la réapparition rapide de ces Algues après la pluie, à la surface du sol. Les premières études des Nostocs ont été faites par VAUCHER en 1803, puis par LYNGBIE en 1812.

Le cycle du développement des Nostocs, c'est-à-dire l'alternance de stades mobiles et immobiles, avec développement de gaines mucilagineuses, a été observé, pour la première fois, par THURET qui signale, dès 1857, que « la colonie tombe en déliquescence et les chapelets se partagent en filaments mobiles ». JANCZEWSKI, en 1874, observe la germination des spores, la différenciation en filaments mobiles, puis en colonies, de deux espèces de *Nostoc*. Enfin BORNET et FLAHAULT ont noté dans leur « *Révision des Nostocacées hétérocystées* », parue en 1886, que ces Algues se présentent sous les formes les plus diverses, suivant les conditions où elles se développent.

ALLISON et ses collaborateurs (1937), dans leur étude sur *Nostoc muscorum*, donnent quelques indications sur le cycle du développement de celui-ci et LAZAROFF (1955) le décrit brièvement après séjour des cultures à l'obscurité.

Dans nos cultures, après requiquage et pendant quelques jours, on observe uniquement la présence de filaments courts, de longueur variable, mobiles, dont les cellules sont végétatives

et ont de 3 à 5 μ de diamètre. Ce sont des trichomes dont la gaine mucilagineuse est extrêmement ténue.

Après plusieurs jours, quand le filament comporte au moins une vingtaine de cellules, par suite de la division des cellules végétatives, certaines d'entre elles se différencient en hétérocystes, cellules réfringentes, à parois épaisses, présentant un bouton cellulosique au niveau de leur jonction avec les autres cellules et, en apparence, optiquement vides à l'examen microscopique. Leur taille est légèrement supérieure à celle des cellules végétatives (5 à 7 μ). Il se produit ainsi une différenciation d'hétérocystes : les uns, terminaux ; les autres, intercalaires. A ce stade, les filaments sont toujours isolés, droits et pratiquement dépourvus de gangue mucilagineuse (Planche III, fig. 6).

Après 3 semaines, les filaments ont continué à s'accroître longitudinalement et sont devenus plus ou moins sinueux, en se repliant sur eux-mêmes. Une épaisse gangue mucilagineuse commence à se différencier. Cette gangue serait constituée, d'après les études de KLEIN (1915) et de HOUGH et de ses collaborateurs (1952) par des pectines et de la cellulose.

Après 5 semaines de culture, la gangue est très épaisse et certaines cellules commencent à se différencier en akinètes, dont la taille est supérieure à celle des cellules végétatives, et la membrane épaisse (Planche III, fig. 7).

Après 6 semaines de culture, quelques cellules commencent à dégénérer, d'autres continuent à se différencier en akinètes et certains akinètes sont formés par deux cellules voisines, comme on peut le voir sur la fig. 8 (Planche III).

Enfin, dans des cultures vieilles, âgées de 4 mois par exemple, presque toutes les cellules sont transformées en akinètes et on peut observer alors des chapelets d'akinètes à l'intérieur de la gangue mucilagineuse (Planche III, fig. 9). J'ai noté souvent une particularité à ma connaissance non encore signalée pour *Nostoc muscorum* : la formation en nombre appréciable d'akinètes, dans lesquels on distingue deux cellules séparées par un plan de division longitudinal et non pas transversal, comme c'est la règle.

Ces akinètes bicellulaires n'ont jamais été observés dans des cultures de la souche isolée par ALLISON, que j'ai pu me procurer par la suite. (Cette souche conservée dans la collection de cultures d'Algues de Cambridge, a été mise à ma disposition par l'intermédiaire de M. GEORGE). Ces cultures étaient établies exactement dans les mêmes conditions que celles de notre souche et examinées au même âge et plus tard. Par ailleurs le développement du *Nostoc* de la souche ALLISON se déroule, dans nos conditions de culture, exactement de la même façon que celui de notre propre souche et

l'aspect morphologique des diverses cellules est absolument identique.

III. — UTILISATION DES FILTRATS DE CULTURE

La recherche des substances métaboliques libérées dans le milieu de culture nécessitait l'utilisation de celui-ci après élimination des cellules. Les milieux de culture débarrassés de cellules par simple filtration sur papier ont ensuite été concentrés. Le volume était réduit de 20 fois à 40° ou à 65°C dans un ballon à distillation sous vide de Claisen. On a obtenu alors un liquide brun ou légèrement rosé à consistance quelque peu visqueuse due sans doute à la présence de fines particules de mucilage passées lors de la filtration. Ce liquide est alors rendu aseptique par passage sur un filtre à membrane cellulosique ou sur ultra-filtre en verre fritté.

Les filtrats ont été utilisés soit tels quels, soit dilués. Comme la teneur absolue en substances actives était inconnue, nous avons simplement noté, dans tout ce qui va suivre, la dilution des filtrats. Celle-ci a été désignée en fonction de la réduction de volume par rapport au filtrat initial en « unités de concentration ». Ainsi par exemple un filtrat dont le volume a été réduit de 20 fois sera désigné par : concentration « 20 » et un filtrat dont le volume a été réduit de 2 fois, par concentration « 2 ».

Les filtrats ainsi concentrés ont été utilisés de la même façon que ceux à l'état brut.

D'une façon générale, ce sont des cultures âgées de 6 semaines qui ont fourni les filtrats. En effet, des essais faits en prélevant quelques cm³ de milieu dans des cultures de différents âges, nous ont montré, que l'action nocive sur les autres Algues se manifeste seulement après 5 à 6 semaines. A ce stade, dans les fioles d'Erlenmeyer les colonies forment des masses gélatineuses, flottant dans le liquide et tapissant en partie le fond. La plupart des cellules sont vivantes et on n'observe qu'un très faible nombre de cellules dégénérées. En conséquence les substances extracellulaires ne sont pas produites par l'autolyse des cellules.

CHAPITRE III

CONDITIONS DE PRODUCTION DE LA SUBSTANCE ANTIBIOTIQUE DU *NOSTOC MUSCORUM* : LA « MUSCORINE »

I. — INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS EXTÉRIEURS

Dans nos conditions expérimentales, le rendement en substances extracellulaires biologiquement actives était assez faible. Il fallait attendre 6 semaines avant de pouvoir utiliser les cultures, et, dans certains cas, celles-ci ne présentaient aucune activité. C'est pour étudier l'influence de divers facteurs extérieurs, susceptibles d'améliorer ce rendement que j'ai tenté de faire varier les conditions de culture.

Pour plus de simplicité, dans tout ce qui va suivre, nous dénommerons la substance douée d'activité biologique issue des cultures de *Nostoc muscorum*, la « muscorine ».

A. — INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE.

Pour l'analyse de cette influence, j'ai utilisé les techniques décrites plus haut. Toutes les conditions de culture, sauf la composition du milieu, ont été par ailleurs standardisées. Les filtrats ont été obtenus comme il a été décrit, les épreuves d'activité biologique ont été réalisées à l'aide du *Cosmarium Lundellii*. Les détails de ces épreuves seront donnés plus loin dans le chapitre V, relatif à l'activité biologique de la muscorine. Les cellules de *Cosmarium* utilisées, ont été introduites dans les « muscorines » à étudier. On a simplement noté le résultat obtenu par (+), lorsque la muscorine inhibait la croissance du *Cosmarium*, et par (—) lorsque la croissance était normale. Pour toutes ces expériences, seuls des filtrats à l'état brut ont été employés.

Chaque série d'expériences comportait au moins 5 cultures parallèles pour chacun des milieux à étudier et des témoins en milieu *Chu*. Toutes ont été faites en fioles d'Erlenmeyer de 150 cm³.

a) Composition en éléments minéraux.

De nombreuses variations du milieu de culture étaient possibles : mais seules quelques-unes ont été analysées ici. Dans une première série d'expériences nous avons simplement modifié la composition du milieu *Chu* (formules, voir tableau III, p. 20).

Ce milieu a été utilisé : d'une part dilué 2 et 10 fois, d'autre part 2 et 5 fois plus concentré que dans la formule originale.

Puis en supprimant successivement :

- 1) le calcium, remplacé par K,
- 2) le potassium, remplacé par Na,
- 3) le sodium, remplacé par K,
- 4) le fer, en supprimant le citrate ferrique,
- 5) les nitrates, en introduisant le calcium sous forme de chlorure (*Nostoc muscorum* fait partie des espèces pouvant fixer l'azote atmosphérique et il peut croître en l'absence d'azote dans le milieu de culture.),
- 6) les phosphates, en introduisant le potassium sous forme de chlorure,
- 7) les nitrates et le calcium à la fois,
- 8) les phosphates et le potassium à la fois.

EYSTER (1952), ayant observé que le bore a un effet favorable pour la croissance du *Nostoc muscorum* et que HOLM-HANSEN et ses collaborateurs (1954) signalent qu'elle est meilleure en présence de cobalt, j'ai utilisé également le milieu *Chu* additionné de quantités variables d'une solution de micro-éléments dont la formule est donnée ci-dessous. (Tableau III).

Les résultats obtenus sont brièvement résumés dans le tableau IV. Pour chacun des cas on a noté le pH au début et à la fin de l'expérience, après 6 semaines de culture, ainsi que les poids des cellules après dessiccation à 105°C. Ce poids a servi pour la mesure de la croissance des cultures. On peut ainsi comparer facilement, quoique d'une façon assez grossière, l'importance de la croissance dans les différents milieux. Des erreurs notables sont dues à la perte de cellules collées sur le fond des fioles. Les chiffres représentent en général les moyennes des valeurs obtenues pour trois lots indépendants. Les données sont homogènes entre les mêmes lots.

Les résultats fournis par les cultures présentant des carences en certains éléments concordent en partie avec ceux obtenus par KRATZ et MYERS (1955) pour l'étude des besoins nutritifs de quelques Cyanophycées. Ces auteurs trouvent que les deux souches de *Nostoc muscorum* isolées respectivement par GERLOFF et par ALLISON, peuvent croître sans calcium mais non fixer l'azote en son absence, que le potassium est nécessaire pour la croissance des deux souches et ne peut être remplacé par du sodium, et enfin, que le sodium est indispensable pour la croissance de l'une des souches, celle de GERLOFF, mais non pour l'autre.

Nos résultats sont légèrement différents de ceux de ces au-

teurs. En l'absence de calcium, notre souche présente également une croissance appréciable. En l'absence de potassium et de sodium, une faible croissance est encore observée. Dans aucun de ces milieux la production de muscorine n'était plus précoce ou plus abondante que dans les témoins.

b) Addition d'éléments organiques.

Bien que la croissance du *Nostoc* soit satisfaisante dans des milieux nutritifs inorganiques il fallait examiner si la présence de certains éléments organiques pouvait favoriser la production de muscorine. Pour cela le milieu *Chu* a été additionné :

1) De glucose (0,5 ou 1 g par litre). Ces cultures ont été effectuées : d'une part, à la lumière ; d'autre part, à l'obscurité. Contrairement à la souche de GERLOFF qui est incapable de se développer en l'absence de lumière sur milieu glucosé, notre souche, comme celle d'ALLISON, présente une croissance appréciable à l'obscurité dans ce cas.

2) D'acétate de sodium (1 g/l.),

3) De Yeast-extract Difco (1 g/l.).

Les filtrats de toutes ces cultures étaient dépourvus de toute activité sur *Cosmarium* (tableau IV, p. 23), bien que la croissance soit parfois plus abondante que dans le milieu *Chu* seul.

c) Autres milieux de culture.

Des cultures dans des milieux ayant une autre composition ont été réalisées dans nos conditions expérimentales. Ce sont les milieux suivants :

TABLEAU III

Composition des milieux utilisés pour la culture du *Nostoc*.

Chu N° 10. — $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$: 0,040 g ; PO_4HK_2 : 0,010 g ; SO_4Mg : 0,025 g ; CO_3Na_2 : 0,020 g ; SiO_3Na_2 : 0,025 g ; Citrate ferrique : 0,003 g ; Acide citrique : 0,003 g ; H_2O bidistillée : q.s. 1000 cm^3 .

Kratz et Myers. — MgSO_4 : 0,250 g ; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$: 1,000 g ; CO_3Na_2 : 1,500 g ; NO_3NH_4 : 0,050 g ; NO_3K : 1,000 g ; $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$: 0,025 g ; Citrate ferrique : 0,006 g ; Sulfate ferrique : 0,004 g ; Solution de microéléments : 1 cm^3 ; H_2O bidistillée : q.s. 1000 cm^3 ; Solution de microéléments : BO_3H_3 : 2,86 g ; Cl_2Mn : 1,81 g ; SO_4Zn : 0,22 g ; MoO_3 : 0,0177 g ; SO_4Cu : 0,79 g ; H_2O bidistillée : q.s. 1000 cm^3 .

Milieu au caséinate de sodium. — Peptone pancréatique : 0,5 g ; caséinate de sodium : 0,5 g ; amidon soluble : 0,5 g ; glycérol : 1 cm^3 ; PO_4HK_2 : 0,2 g ; SO_4Mg : 0,05 g ; FeCl_3 : traces ; eau bidistillée : q.s. 1000 cm^3 .

Solution de Lefèvre (dite L+C) — NO_3K : 0,100 g ; PO_4HK_2 : 0,940 g ; SO_4Mg : 0,030 g ; $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$: 0,100 g ; FeCl_3 : traces ; extrait de terre : 10 cm^3 ; extrait de Sphagnum : 10 cm^3 ; eau bidistillée : q.s. 1000 cm^3 . Le pH de cette solution est de 6,8.

Milieux de Walp à différents pH

	pH=5,0 N°1	pH=7,0 N°2	pH=7,7 N°3	pH=5,0 N°1 sans NO ₃	pH=7,0 N°2 sans NO ₃	pH7,7 N°3 sans NO ₃
KH ₂ PO ₄	0,781 g	0,273 g	—	0,758 g	0,273 g	—
K ₂ HPO ₄	—	0,650 g	1,000 g	0,030 g	0,650 g	1,000 g
KCl	0,428 g	0,150 g	—	0,415 g	0,150 g	—
NaNO ₃	1,000 g	1,000 g	1,000 g	—	—	—
MgSO ₄	0,300 g	0,300 g	0,300 g	0,300 g	0,300 g	0,300 g
NaCl	0,100 g	0,100 g	0,100 g	0,100 g	0,100 g	0,100 g
CaCl ₂	0,100 g	0,100 g	0,100 g	0,100 g	0,100 g	0,100 g
FeCl ₃	traces	traces	traces	traces	traces	traces
H ₂ O	bidistillée	1000 cm ³				

Comparaison de la teneur en éléments essentiels des divers milieux. Teneur en mg/l.

	Chu	Kratz et Myers	Walp	
N	7	150	160	
P	1,8	220	171 à 220	
Na	19	645	309	Milieu sans NO ₃ = 39
K	2,2	670	280 à 440	
Mg	2,4	24	27	
Ca	10	5	36	
Fe	0,2	1,68	traces	
Extrait sec	115	3835	2500	

1) Le milieu utilisé par KRATZ et MYERS tel quel et dilué 10 fois.

2) Les milieux utilisés par WALP et SCHOPBACH (1942), pour l'étude de l'influence du pH sur la croissance du *Nostoc*. Dans ce milieu la croissance de *Nostoc muscorum*, souche ALLISON est meilleure à pH alcalin qu'à pH acide, mais elle est possible jusqu'à pH = 4,5. Pour notre souche, la croissance est également plus abondante en milieu alcalin qu'en milieu neutre, mais la croissance n'est plus possible en milieu acide à pH = 5,0,

3) Le milieu au caséinate de sodium, employé par TAYLOR (1947) pour la culture des Bactéries de l'eau et utilisé pour les tests de contrôle bactériologique. La croissance du *Nostoc* y est très peu abondante.

La composition de tous ces milieux est consignée dans le tableau III.

Les résultats des épreuves d'activité sur *Cosmarium* sont donnés dans le tableau IV. Toutes ces épreuves sont négatives, à l'exception de celles de cultures en milieu *Chu* et en milieu *Walp* n° 3. Dans ce cas, la production de muscorine n'était pas plus abondante que dans le milieu *Chu*.

D'après ces résultats on peut conclure que :

1) La production de muscorine en quantités appréciables par le *Nostoc* est indépendante de la rapidité et de l'importance du développement de l'Algue : les cultures où la croissance est la plus abondante ne sont pas celles qui fournissent les filtrats les plus actifs.

2) Le pH auquel on effectue la culture ne joue pas un rôle déterminant pour la production de muscorine. Les cultures faites à un même pH, telles celles dans les milieux *Chu* et *Chu*+glucose, par exemple, qui fournissent des poids de cellules après dessiccation identiques, donnent des filtrats, l'un actif et l'autre inactif.

3) La carence en certains éléments minéraux ne semble pas jouer de rôle direct pour l'élaboration de la muscorine.

4) Dans la plupart des milieux additionnés de composés organiques, la muscorine n'est pas produite.

Le milieu le plus favorable pour la production dans ces conditions expérimentales est donc le milieu *Chu*. On remarquera que, dans ce même milieu, la muscorine est produite, lorsqu'on l'utilise à une concentration double de la normale, mais qu'elle n'est plus décelable dans le milieu lorsque celui-ci est 5 fois plus concentré que normalement. Dans les milieux très dilués, la muscorine n'est pas décelable non plus. Il semble que, pour qu'il y ait production de muscorine il faut se placer dans des conditions telles que la croissance soit suffisante mais non optimale.

d) *Modifications de l'aspect des cultures et de la morphologie des cellules dans les différents milieux.*

Au cours de ces expériences, j'ai pu observer que l'aspect des cultures est variable dans les différents milieux. Les colonies forment soit des grumeaux ou des pellicules plus ou moins étalées, soit des arborescences.

TABLEAU IV

Influence de la composition du milieu de culture sur la production de muscorine.

Milieu	pH initial	pH après 6 semaines de culture	Poids des cellules sdc <i>Nostoc</i> mg/l après dessiccation	Activité sur <i>Cosmarium</i>
Chu.....	6,8	7,8	382	
Chu dilué 2 fois	6,8	7,6	200	
Chu dilué 10 fois	5,9	7,1	faible croissance	
Chu 2 fois concentré	6,8	8,2	250	
Chu 5 fois concentré	7,8	8,2	420	
Chu sans Ca (NO ₃) ² Ca remplacé par NO ₃ K..	7,0	7,8	111	
Chu sans K (remplacé par Na)...	7,0	7,6	62	
Chu sans Na (remplacé par K)...	7,1	7,6	52	
Chu sans nitrates avec Ca (CaCl ₂)	7,1	7,1	292	
Chu sans PO ₄ avec K (ClK) ...	7,1	7,6	92	
Chu sans NO ₃ et sans Ca.....	7,0	8,6	100	
Chu sans PO ₄ et sans K.....	7,1	7,1	30	
Chu + oligo-éléments	6,8	6,8		
Chu + 0,5 g/l glucose à la lumière	7,0	7,0	365	
Chu + 1 g/l glucose à la lumière.	7,2	7,0	693	
Chu + 0,5 g/l glucose obscurité ..	7,0	7,0	53	
Chu + 1 g/l glucose obscurité	7,2	7,2	31	
Chu + 1 g/l Acétate Na.....	7,2	8,2		
Chu + 1 g l Yeast extract	6,6	7,8	207	
Kratz et Myers sans barbotage d'air.....	9,0		faible croissance	
Kratz et Myers dilué 10 fois	8,6	8,2	555	
Walp n° 1	5,0		pas de croissance	
Walp n° 2	7,0	7,2	571	
Walp n° 3	7,9	8,2	663	
Walp n° 1 sans NO ₃	5,0		pas de croissance	
Walp n° 2 sans NO ₃	7,0	7,0	520	
Walp n° 3 sans NO ₃	7,7	7,6	150	
Caséinate de Na	7,2	7,2	très faible croissance	

L'examen microscopique permet d'observer que trois des caractéristiques principales des cellules changent suivant le milieu utilisé :

1) l'importance du développement de la gangue mucilagineuse.

2) la présence ou l'absence d'hétérocystes.

3) la présence ou l'absence de granulations dans les cellules, visibles à l'examen direct et colorables par le chlorure de tétrazolium.

L'aspect et les caractéristiques pour chacune des cultures sont résumés dans le tableau V.

On peut voir, d'après ces résultats, que seules les cultures présentant un développement important de la gangue et des hétérocystes ont fourni des filtrats actifs. Ces deux conditions sont nécessaires mais non suffisantes. En effet, par exemple, les cellules des cultures en milieu de *Kratz et Myers* dilué 10 fois, présentent à peu près le même aspect morphologique que celles des cultures en milieu *Chu* de même âge. La gangue est épaisse et il y a de nombreux hétérocystes. Pourtant leur activité est nulle.

La présence de cyanophycine à l'intérieur des cellules n'est très apparente que dans des conditions où la production de muscorine est pratiquement nulle. Dans le milieu *Chu* on n'en observe que peu, au moment de la filtration. Ceci pourrait peut-être servir pour caractériser les cultures productrices, où les conditions sont telles que les cellules se développent bien mais n'accumulent pas de réserves intracellulaires.

Mentionnons ici que quelques essais faits pour obtenir la muscorine directement à partir des cellules, soit par broyage, soit par traitement aux ultra-sons n'ont donné que des résultats négatifs.

B. — INFLUENCE DE L'AÉRATION.

Quelques cultures avec barbotage d'air ont été établies pour étudier l'influence de ce facteur. Pour cela, un courant d'air chargé de 2% de CO₂ passe dans le milieu contenu dans des boîtes de Roux. Deux milieux différents ont été utilisés : le milieu *Chu* et le milieu de *Kratz et Myers*. Dans chacun des cas, des témoins sans barbotage d'air ont été établis en même temps. Les épreuves d'activité sur *Cosmarium* donnent toutes des résultats négatifs

TABLEAU V
Variations de l'aspect et de la morphologie des cultures dans différents milieux.

Milieu	Age de la culture	Couleur de la culture	Aspect des filaments	Gangue	Hétérocystes	Granulations lipoprotéiques	Production de muscorine
Chu	6 sem.	jaunâtre	très sinueux	épaisse	nombreux	peu	+
Kratz et Myers (dilué 10 fois)	6 sem.	jaunâtre	très pelotonnés	épaisse	nombreux	nombreux	—
Kratz et Myers	6 sem.	bleu-vert	droits, cellules séparées 2 à 2 par des constriction	absente	très peu	nombreux	—
Chu dilué 2 fois	6 sem.	bleu-vert	isolés, droits	absente	nombreux	assez nombreuses	—
Chu sans Ca	6 sem.	jaune	± pelotonnés	épaisse	nombreux	assez nombreuses	rarement +
Chu sans nitrates	8 mois	jaune	droits	ténue	peu	nombreux	—
Walp N° 3	6 sem.	bleu-vert	± pelotonnés, cellules grandes	épaisse	assez nombreux	peu	+
Walp n° 2	6 sem.	bleu-vert	droits	peu importante	peu	nombreux	—
Chu + glucose (lumière)	8 sem.	bleu-vert	sinueux	épaisse	assez nombreux	peu nombreux	légèrement +
Chu + glucose	8 mois	bleu-vert	sinueux	épaisse	assez nombreux	nombreux	légèrement +
Chu + yeast extract	6 sem.	bleu-vert	sinueux	ténue	assez nombreux	très nombreux	—

pour les cultures faites en milieu de *Kratz*. Celles en milieu *Chu* avec ou sans barbotage d'air exercent toutes, après 6 semaines de culture, la même action inhibitrice sur *Cosmarium*.

Il en résulte que l'aération des cultures ne semble pas modifier ou accélérer, la production de muscorine.

C. — INFLUENCE DE L'INTENSITÉ LUMINEUSE REÇUE PAR LES CULTURES.

Ce facteur n'a pas été examiné avec beaucoup de détail. En effet, on sait que les cultures de Cyanophycées peuvent recevoir des éclairagements très variables (JAGG, 1945). Dans nos conditions standard habituelles les cultures recevaient un éclairagement de 2200 Lux. Des fioles d'Erlenmeyer exposées loin des lampes, sur des rayonnages, ne recevaient qu'un éclairagement de 1000 Lux, elles produisaient de la muscorine de la même façon que les autres cultures. L'éclairagement nécessaire pour obtenir la production de muscorine semble pouvoir varier dans de larges limites.

D. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE.

Habituellement les cultures étaient maintenues à 27° C. Des cultures faites à 22° C produisaient de la muscorine. Plusieurs lots de culture en milieu *Chu* ont été maintenus respectivement à 39, 35 et 30° C dans des bacs en verre contenant de l'eau chauffée. Pour que les éclairagements reçus soient identiques, les cultures témoin, ont été maintenues sous une même épaisseur d'eau. A 39° C la croissance n'est pas possible bien qu'une partie des cellules soit restée vivante.

A 35° C la croissance est très lente et après 50 jours de culture les épreuves d'activité sur *Cosmarium* sont toujours négatives alors que celles des témoins sont positives.

A 30° C, la croissance est comparable à celle obtenue à 27° C. et les épreuves sur *Cosmarium* sont positives pour la plupart des cultures.

La muscorine est donc produite dans des limites de température permettant une bonne croissance de l'Algue, entre 20 et 30° C.

II. — INFLUENCE DE FACTEURS INTERNES

A. — AGE DES CULTURES SERVANT A L'INOCULATION.

Etant donné le cycle du développement du *Nostoc*, des variations importantes de l'état physiologique des cellules doivent intervenir au cours du vieillissement de la culture. Dans les conditions expérimentales habituelles, les cultures servant à l'inoculation étaient âgées de 6 à 8 semaines. Pour étudier l'influence de l'âge de l'inoculat, une ou des cultures du même lot ont servi pour l'ensemencement, à des âges différents. Seules des cultures ayant donné elles-mêmes un résultat positif pour l'épreuve sur *Cosmarium* ont été utilisées pour ces inoculats. Leur âge variait de 4 semaines à 5 mois. L'examen microscopique a permis de constater qu'il reste des cellules végétatives dans toutes, à l'exception de la culture âgée de 6 mois, qui ne présente plus que des akinètes. Les épreuves d'activité ont toutes été effectuées après 6 semaines de culture. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VI.

On peut voir que, dans ces conditions, la muscorine est produite après 6 semaines de culture, quel que soit l'âge de l'inoculat. On remarque que, dans presque tous les lots, il y a des cultures donnant un résultat négatif pour l'épreuve sur *Cosmarium*, mais

TABLEAU VI

Influence de l'âge de la culture servant à l'inoculation sur la production de muscorine.

Les chiffres indiquent le nombre de cultures testées, (+) et (—) l'activité ou l'absence d'activité sur *Cosmarium* après 6 semaines de culture.

Age de la culture servant à l'inoculation	N° des cultures servant à l'inoculation			
	N° 40-133	N° 40-170	N° 40-170 A	N° 480
4 semaines	13 (+) 1 (—)			
6 semaines		7 (+) 3 (—)		21 (+) 1 (—)
8 semaines		16 (+) 3 (—)	7 (+) 2 (—)	17 (+) 5 (—)
11 semaines		16 (+) 1 (—)	6 (+) 3 (—)	5 (+) 2 (—)
3 mois		11 (+)	4 (+) 1 (—)	
5 mois		5 (+)		

la proportion de celles-ci ne semble pas dépendre de l'âge des cellules servant à l'inoculation.

B. — CULTURES PRODUCTRICES OU NON DE MUSCORINE.

Nous venons de voir que, dans un même lot de cultures, quelques-unes d'entre elles ne produisent pas de muscorine. Pour plus de clarté nous appellerons, dans ce qui va suivre ces cultures, des cultures « inactives » et les autres « actives ».

Je me suis assurée que cette absence d'activité n'était pas simplement due à un retard de croissance. Les cultures « inactives » testées à intervalles réguliers jusqu'à l'âge de 3 mois n'ont jamais présenté d'activité.

Dans le cadre de ce travail l'étude de ces cultures « inactives » n'était pas particulièrement intéressante puisqu'il s'agissait avant tout d'obtenir le plus possible de muscorine. Je les ai donc éliminées et je me suis toujours assurée avant d'utiliser une culture pour de nouveaux ensemencements, qu'elle produisait bien de la muscorine.

Disons simplement ici que la proportion des cultures « inactives » était d'environ $1/4$. Pour certains lots la totalité des cultures était « inactive ». Quelques essais faits en utilisant systématiquement des cultures « inactives » pour l'inoculation, n'ont donné que des cultures « inactives ».

D'autre part, la souche de *Nostoc muscorum* isolée par ALLISON, cultivée en milieu *Chu*, dans les mêmes conditions que notre souche, n'a jamais produit de muscorine, même après une série de repiquages successifs. Il n'est pas impossible que des facteurs génétiques soient responsables de la production ou de l'absence de production de muscorine.

En résumé, il n'a pas été possible d'améliorer ou d'influencer la production de muscorine par les modifications apportées à nos conditions de culture standard. En conséquence, les meilleurs résultats sont obtenus avec des cultures âgées de 6 semaines, établies en milieu *Chu* à 27°C , recevant un éclaircissement de 2200 Lux et présentant une large surface d'aération mais sans barbotage d'air.

CHAPITRE IV

ÉTUDE CHIMIQUE DE LA MUSCORINE

Après avoir utilisé la muscorine des filtrats bruts, nous nous sommes efforcée, dans cette partie du travail, d'étudier quelques-unes de ses caractéristiques physiques et chimiques et de la purifier.

I. — EXTRACTION ET PURIFICATION

A. — PAR SOLVANTS.

Le but des essais suivants était de connaître les caractéristiques de solubilité de la fraction douée d'activité antibiotique et de permettre, le cas échéant, son extraction par solubilité différentielle.

a) *Solubilité dans l'alcool.*

Lorsqu'on traite la muscorine concentrée par de l'alcool à 95° il se forme un précipité mucoïde incolore. L'addition d'alcool par petites quantités permet la séparation de plusieurs fractions, dont l'activité antibiotique a été étudiée séparément. On a noté simplement par « actif » et « inactif » le résultat des épreuves d'antibiase. Les précipités ont été éliminés par centrifugation et décanation. Les fractionnements suivants ont été obtenus :

Fractionnement A : Filtrat brut + 2 volumes d'alcool → Précipité inactif + liquide surnageant, actif.

Fractionnement B : Surnageant + 5 volumes d'alcool → Précipité inactif + liquide surnageant actif.

Ensuite, l'addition de quantités plus grandes d'alcool au liquide surnageant ne permet pas d'autre fractionnement.

Par conséquent la partie des filtrats contenant la fraction douée d'activité antibiotique n'est pas précipitée ni dénaturée par l'alcool. Elle est au contraire soluble dans celui-ci.

b) *Solubilité dans l'éther éthylique.*

Lorsqu'on effectue une extraction de la muscorine par l'éther éthylique, l'éther prend une teinte jaune clair. La fraction biologiquement active de la muscorine est contenue dans la partie soluble dans l'éther éthylique. Les extraits ainsi obtenus, resus-

pendus dans un milieu aqueux sont actifs sur le *Cosmarium*. En outre on peut également effectuer un test d'activité sur *Staphylococcus aureus*. Pour cela on étale à la surface d'une boîte de Pétri contenant un milieu nutritif gélosé quelques gouttes d'une culture de *St. aureus* en phase exponentielle. On pose au centre de la boîte ainsi préparée un disque de papier imprégné de l'extrait à examiner. Après 24 heures d'incubation à 37°C on peut déterminer si l'extrait utilisé produit ou non une zone d'inhibition autour du disque.

Les extraits obtenus par l'éther éthylique, actifs sur le *Cosmarium*, ont toujours exercé une action antibiotique très nette sur le *Staphylococcus*. La fraction active de la muscorine est constituée par un pigment jaune. Elle conserve ses propriétés biologiques vis-à-vis des divers organismes examinés, après extraction. Le travail ultérieur a, en conséquence, été effectué avec des extraits obtenus de cette façon. Cette fraction est également extractible par d'autres solvants organiques non miscibles à l'eau, par exemple par le chloroforme, l'éther de pétrole et le benzène. Ils se colorent en jaune comme l'éther éthylique. On trouvera plus loin les résultats du dosage biologique obtenu avec ces extraits.

Les quantités de muscorine ainsi extraites étaient faibles. C'est pour obtenir une amélioration du rendement que l'influence du pH au moment de l'extraction a été examinée.

Des observations préliminaires avaient permis d'établir que le pH des cultures au moment de la filtration peut varier de 7,2 à 8,4. A la concentration « 20 », ce pH se situe toujours aux environs de 9,0 et la coloration est alors rose. Si on additionne quelques gouttes d'une solution d'acide chlorhydrique à la muscorine ainsi concentrée, elle vire au jaune. L'activité biologique est conservée après plusieurs passages d'un milieu acide à un milieu alcalin et vice-versa.

Pour étudier plus précisément le rôle du pH plusieurs filtrats sont traités par l'éther éthylique après réduction de volume de 20 fois, par portions de 50 cm³ par l'éther éthylique.

- 1) à pH=9,2
- 2) à pH=1,0 (après addition de HCl 1/N et virage au jaune)
- 3) à pH=7,5 (en présence de tampon phosphate)
- 4) une deuxième fois à pH=1,0 la partie aqueuse de la portion traitée une première fois à pH=9,2. On obtient encore, dans ce cas, une coloration jaune de l'éther.

Les poids d'extraits obtenus pour l'une de ces muscorines ont été pour 50 cm³ de filtrat brut traités :

à pH=9,2 : $1,1 \cdot 10^{-4}$ g.

à pH=1,0 : $2,5 \cdot 10^{-3}$ g.

à $\text{pH}=1,0$ après une première extraction en milieu alcalin : $2,3 \cdot 10^{-3}$ g.

En milieu acide les rendements sont donc bien supérieurs à ceux obtenus en milieu alcalin.

L'activité biologique de ces 4 extraits établie à l'aide du *Cosmarium* et du *Staphylococcus*, a donné les résultats suivants :

pH du milieu au moment de l'extraction	Activité sur	
	<i>Cosmarium</i>	<i>Staphylococcus</i>
9,2.....	Actif	Actif
1,0.....	Actif	Actif
7,5.....	Actif	Actif
deuxième extraction 1,0 (por- tion (4)	Actif	Actif

On peut voir que, quel que soit le pH d'extraction, l'activité de la muscorine sur les deux organismes est conservée. Les épreuves sur *Staphylococcus* n'ont pas été faites de façon quantitative. Pour *Cosmarium*, l'activité était identique, à dose égale dans les 4 cas. Les détails de ces dosages seront donnés dans le chapitre V. Par la suite puisque la quantité d'extrait obtenue est supérieure après acidification, toutes les opérations ont été faites en milieu chlorhydrique.

Par ailleurs, j'ai étudié l'activité, sur le *Cosmarium* et sur le *Staphylococcus*, d'extraits obtenus à partir de filtrats concentrés par évaporation sous pression réduite, d'une part à 40°C , d'autre part à 65°C . A ces deux températures, aucune différence n'a pu être observée pour les extraits et en conséquence les évaporations ont été effectuées à 65°C , température qui accélère considérablement la concentration du produit.

B. — PAR CHROMATOGRAPHIE.

a) Chromatographie sur papier.

Les extraits obtenus par l'éther éthylique, ne contiennent pas la fraction active à l'état pur. C'est pour la purifier davantage, que j'ai effectué quelques essais de **chromatographie sur papier**.

Etant donné les faibles quantités d'extraits actifs disponibles, j'ai adopté la technique de chromatographie ascendante de LEFORT et SIGNOL (1955) qui permet de travailler avec des quantités peu importantes des substances à étudier.

Quelques-uns de ces chromatogrammes ont été effectués en milieu acide, d'autres en milieu alcalin.

Les solvants utilisés étaient les suivants :

Ether de pétrole, acétone, benzène en proportions en volume de 8,5 ; 1 ; 0,5 ;

Butanol, H_2O , acide acétique en proportions en volume de 4 ; 5 ; 1 ;

Solution aqueuse de carbonate de potassium à 10%, acétone, éther de pétrole en proportions diverses.

Tous ces chromatogrammes ont fourni une tache plus ou moins brunâtre au point de départ et une zone incolore toutes deux dépourvues d'activité biologique. On trouve, en front de solvant, des taches pigmentées, soit jaunes, soit roses, suivant le pH du solvant, présentant une fluorescence bleue en lumière ultra-violette, plus ou moins étalées, contenant la partie active sur le *Cosmarium* et sur le *Staphylococcus*.

Dans tous ces chromatogrammes, les taches contenant la muscorine sont étalées et leur activité n'est pas plus forte que celle du produit utilisé avant chromatographie.

Les impuretés extraites des filtrats par l'éther éthylique, accompagnant la muscorine ont donc des poids moléculaires voisins de celui de la fraction active et on ne peut pas les séparer facilement par chromatographie sur papier. C'est pourquoi nous avons utilisé ensuite la **chromatographie sur colonnes** pour tenter cette séparation.

b) *Chromatographie sur colonnes.*

Ces essais ont été réalisés sur colonne d'alumine d'après le procédé décrit par SCHOENTAL avec un extrait chloroformique obtenu en milieu acide. Lorsque les filtrats sont soumis à l'extraction par le chloroforme, on obtient un épais précipité protéinique, formant émulsion avec le chloroforme, que l'on peut séparer par centrifugation. Le chloroforme est coloré en jaune, comme l'éther éthylique. Après passage de la solution chloroformique sur la colonne on obtient, dans le haut, un anneau jaune vif. On élue celui-ci avec de la potasse à 10%. La coloration jaune vire au violet et le produit pigmenté descend le long de la colonne. On peut recueillir une fraction violette, donnant un précipité jaune en présence d'acide chlorhydrique concentré. On précipite en même temps de l'oxyde d'alumine. Après centrifugation on obtient une mince couche de précipité jaune à la surface du culot de centrifugation. Ce précipité est soluble dans l'acétone.

Après évaporation à sec de cet extrait acétonique on obtient, un résidu jaune amorphe. Celui-ci, redissous dans le benzène, cristallise après évaporation en aiguilles jaunes. Ces aiguilles donnent des épreuves positives pour l'activité antibiotique sur *Cosmarium* et sur *Staphylococcus*.

Par la suite pour obtenir des rendements meilleurs et une pureté plus grande, les chromatographies ont été réalisées sur colonnes d'acide silicique sur les conseils de M. le Professeur E. LEDERER. En faisant passer un extrait chloroformique de muscorine sur une telle colonne, préparée en mélangeant l'acide silicique avec du chloroforme, on obtient un anneau jaune vif adsorbé à la partie supérieure de la colonne. On peut éluer celui-ci, par le benzène contenant 10% d'éther éthylique. On recueille ainsi une solution jaune qui cristallise sous forme d'aiguilles.

On peut obtenir la sublimation de ces aiguilles et recueillir séparément les fractions sublimant à différentes températures. A basse température à la pression normale la sublimation n'est pas possible, mais elle a lieu entre 110 et 130° C, sous vide de 0,3 mm de mercure. On obtient ainsi 4 fractions :

- 1) Des impuretés blanches.
- 2) De fines aiguilles jaune clair.
- 3) De grosses aiguilles jaunes.
- 4) Un résidu brun restant au fond du tube.

L'activité biologique de ces 4 fractions a été vérifiée sur le *Cosmarium* et sur le *Staphylococcus*. On obtient les résultats suivants :

	Activité sur <i>Cosmarium</i>	Activité sur <i>Staphylococcus</i>
1) Impuretés blanches	Inactif	Inactif
2) Microaiguilles	Actif	Actif
3) Grosses aiguilles	Actif	Actif
4) Résidu brun.....	Inactif	Inactif

La fraction biologiquement active est contenue dans les deux parties cristallines jaunes. Il reste, après sublimation, des gouttelettes huileuses transparentes entre les aiguilles cristallines. C'est pour tenter de séparer la fraction cristallisable de cette huile que les extractions ont ensuite été faites par l'éther de pétrole (fraction légère distillant entre 35 et 40°C).

c) Rendements obtenus par les divers procédés d'extraction.

La quantité d'extrait varie, d'une part avec le procédé d'extraction ; d'autre part, avec le filtrat utilisé. Le tableau VII donne les rendements pour quelques-uns des filtrats étudiés. Les extractions ont été faites en milieu acide, sauf pour la muscorine N° 100.

On observe que la quantité d'extrait obtenue varie suivant les filtrats traités : les cultures, bien que faites dans des condi-

TABLEAU VII

Poids d'extraits obtenus par divers solvants pour quelques filtrats étudiés, exprimés en g/l de filtrat non concentré.

N° du filtrat traité	Extraction par	
	Ether éthylique	Ether de pétrole de cristallisation
100 (milieu alcalin)	$8 \cdot 10^{-3}$	
165.....	$1 \cdot 10^{-2}$	
405.....		$6 \cdot 10^{-4}$
511.....	$1,5 \cdot 10^{-1}$	
904.....	$3,1 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$
904 bis.....	$1 \cdot 10^{-4}$	
1000.....	$2,4 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$
1006.....		$6,08 \cdot 10^{-4}$

lions standard, ne donnent pas toujours un rendement égal en muscorine.

Les dosages biologiques, dont les résultats seront discutés plus loin, permettent de conclure que le produit cristallisé est bien responsable de l'activité antibiotique qui est dix fois plus forte que celle des extraits obtenus par l'éther éthylique. La purification est meilleure pour le produit cristallisé que pour ces extraits.

II. — CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE LA MUSCORINE

A. — CARACTÈRES PHYSIQUES.

Quelques caractéristiques physiques de la muscorine ont pu être déterminées.

1) La molécule responsable de l'activité antibiotique est de taille relativement petite : elle est *dialysable*.

2) La muscorine n'est pas constituée par une molécule protéique : elle est *thermostable*. Elle conserve ses propriétés après un traitement de 20 minutes à l'autoclave à 120°C, lorsqu'elle est à l'état brut, et après sublimation sous vide à 130°C à l'état cristallisé. L'activité n'est nullement modifiée lorsqu'on maintient les filtrats bruts à 56°C pendant 2 heures.

3) La muscorine cristallise sous forme d'aiguilles très fines, jaunes ou orangées en milieu acide.

4) Le point de fusion de ces aiguilles est de 198°C .

5) Les aiguilles cristallines subliment sous vide de 0,3 mm de mercure entre 110 et 130°C .

6) Les caractéristiques de solubilité de la muscorine sont les suivantes :

En milieu acide les cristaux jaunes sont solubles dans les solvants organiques (alcool, chloroforme, benzène, éther éthylique, éther de pétrole) et très peu solubles dans l'eau.

En milieu alcalin, la coloration des cristaux vire au violet et ils deviennent solubles dans l'eau.

7) Les courbes d'absorption de la lumière, étudiées au spectrophotomètre de Beckman sont représentées dans le graphique n° 1.

On voit d'après ces courbes que la solution alcoolique en milieu acide du produit cristallisé (courbe n° 1), présente en lumière ultra-violette un maximum d'absorption pour $\lambda=275$ et un minimum pour $\lambda=305\text{ m}\mu$ et en lumière visible un maximum pour $\lambda=430\text{ m}\mu$.

La courbe obtenue après alcalinisation de cette solution (courbe n° 2) est un peu différente de la courbe n° 1. Les maxima sont légèrement déplacés et le minimum pour $\lambda=305\text{ m}\mu$ est beaucoup moins accentué.

Enfin, le spectre d'absorption des cristaux dissous dans l'acide sulfurique concentré (courbe n° 3) présente, dans l'ultra-violet, un minimum pour $\lambda=290\text{ m}\mu$ et un maximum pour $\lambda=325\text{ m}\mu$ et, en lumière visible, un maximum pour $\lambda=470\text{ m}\mu$.

8) Le filtrat présente une fluorescence jaune-verte en lumière ultra-violette. La solution alcaline des aiguilles cristallines présente cette même fluorescence. Elle devient jaune-orangée dans l'anhydride acétique et verte dans l'acide sulfurique.

B. — CARACTÈRES CHIMIQUES.

Quelques propriétés chimiques du produit cristallisé ont pu être déterminées.

1) La solution alcoolique n'est pas réduite en présence de dihydrosulfite de sodium.

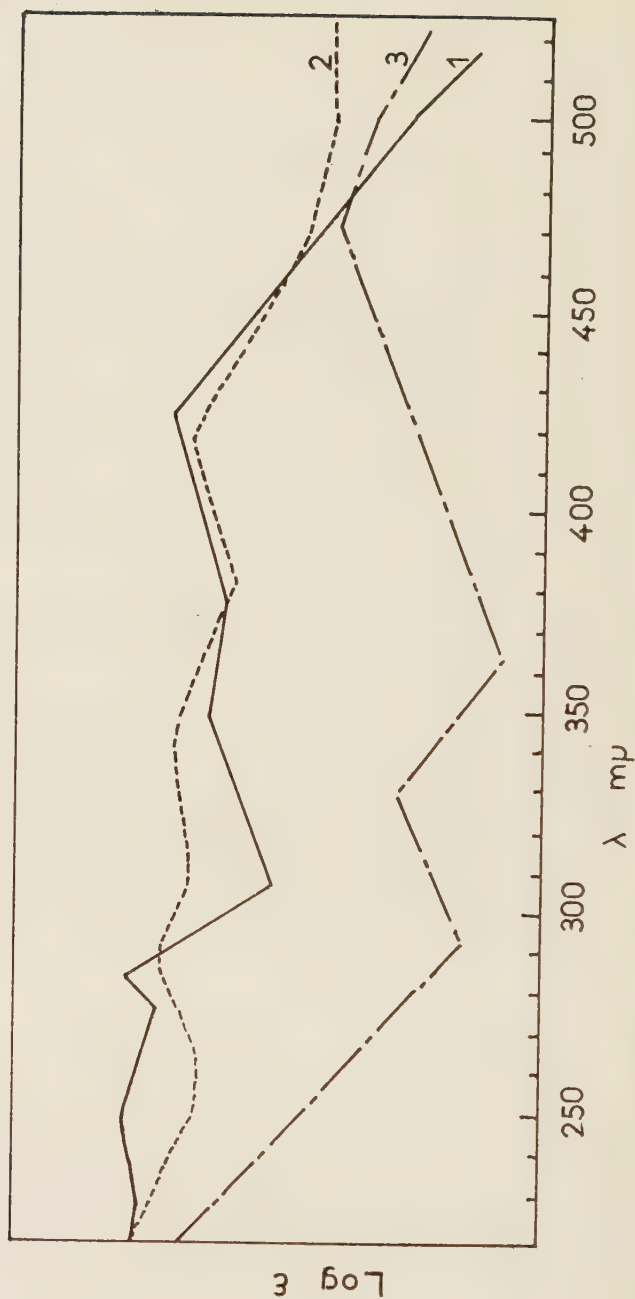
2) En présence d'acide sulfurique concentré la couleur vire au rouge, les changements de teinte suivant le pH du milieu et les caractéristiques de solubilité permettent un rapprochement avec les anthraquinones.

3) La réaction au pyroboroacétate est positive (formation de

GRAPHIQUE N° 1

Spectres d'absorption du produit cristallisé.

- N° 1. ———— Aiguilles cristallines dissoutes dans l'alcool en milieu acide.
 N° 2. - - - - - Aiguilles cristallines dissoutes dans l'alcool en milieu alcalin.
 N° 3. - · - · - Aiguilles cristallines dissoutes dans l'acide sulfurique concentré.



laque violette en présence d'acide pyroboracétique), ce qui indique la présence de deux fonctions -OH voisines.

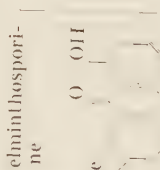
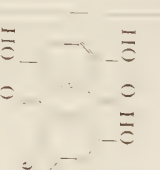
4) *La réaction à la benzidine est négative* et indique l'absence d'azote dans la muscorine.

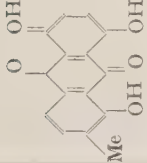
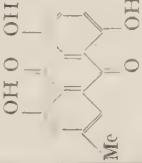
Ces caractéristiques permettent d'attribuer au produit cristallisé étudié une structure de *dihydroxy-anthraquinone*. Nous avons donc recherché les caractéristiques de quelques anthraquinones d'origine biologique pouvant se rapprocher de celles de la muscorine. On connaît surtout des anthraquinones d'origine végétale produites par des plantes supérieures ou par des Champignons. Elles peuvent représenter une part importante du métabolisme chez les Champignons qui les produisent. Beaucoup d'entre elles sont bien connues et sont utilisées depuis fort longtemps, comme par exemple l'alizarine extraite de la garance. D'autres encore possèdent des propriétés antibiotiques (BIRKINSHAW, 1956).

Dans le tableau VIII, les caractéristiques connues pour quelques-unes de ces dihydroxyanthraquinones, qui se rapprochent le plus de la muscorine, ont été relevées.

La muscorine est une dihydroxyanthraquinone : mais, toutefois, il n'a pas été possible d'établir sa formule exacte étant donné les faibles quantités de muscorine cristallisée dont nous disposions. L'existence de telles substances n'a pas encore été signalée, à ma connaissance, chez les Algues.

TABEAU VIII
Caractéristiques physiques et chimiques de la muscorine et de quelques substances voisines.

Substances	Forme de cristallisation	Point de fusion	Solubilité	λ Maximum	Couleur en milieu alcalin	Couleur dans SO_4H_2	λ Maximum milieu alcalin	λ Maximum SO_4H_2	Fluorescence	Réaction Pyroboracétate	Remarques
	Aiguilles rouges	198°	très	Dans l'alcool 478-502 515 $\text{m}\mu$	bleu		560-605 $\text{m}\mu$	477-510 550 $\text{m}\mu$	jaune-vert (éther)	+	
											Isolé de mycélium d'Helminthosporium graminum cultures avec glucose seule source carbonée.
	Aiguilles rouges	227°			bleu	violet		550-590 $\text{m}\mu$	verte (SO_4H_2)	+	

	Aiguilles rouges	270°		violet		+
Emodine 	Aiguilles oranges	256°	Insoluble dans l'eau	rouge	rouge	Isolé de Rhubarbe Sublime
Muscovine	Aiguilles jaunes-orangées	198°	Peu soluble dans l'eau ; soluble dans les solvants organiques	violet	jaune 280 425 mμ	Isolé du milieu de culture d'une Cyanophyce Sublime.

CHAPITRE V

ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DE LA MUSCORINE

Dans ce qui précède, nous avons vu que les cultures de *Nostoc muscorum* libèrent, dans le milieu, des produits du métabolisme, à structure d'anthraquinones, qui exercent une action inhibitrice sur la croissance de certains autres organismes. Cette action a surtout été étudiée à l'aide du *Cosmarium Lundellii*. Toutefois, cet organisme n'est pas le seul qui y soit sensible. J'ai pu observer que d'autres Algues, certaines Bactéries et une Levure de boulangerie présentent également des réactions diverses à la muscorine. Cette action est variable suivant les doses utilisées. Dans ce qui suit, nous allons étudier les conditions de l'action des filtrats et du produit purifié sur ces divers organismes.

I. — DOSAGE BIOLOGIQUE

A. — CHOIX D'UN ORGANISME TEST.

Nous avons vu que les filtrats bruts de cultures de *Nostoc muscorum* exercent une action nocive sur certaines Algues. Cette nocivité est variable suivant le lot de cultures utilisé. Pour pouvoir l'apprécier et comparer à ce point de vue les divers filtrats entre eux, il fallait trouver une méthode d'étalonnage.

L'observation des diverses Algues introduites dans la muscorine, permet de constater que certaines d'entre elles présentent, peu de temps après la mise en contact, un aspect morphologique anormal, souvent même elles meurent. Trois espèces sont particulièrement sensibles à l'action toxique : *Phormidium uncinatum*, *Euglena mutabilis*, *Cosmarium Lundellii*. Pour établir une méthode d'étalonnage basée sur l'activité biologique de la muscorine, nous avons choisi *Cosmarium Lundellii*.

Ce *Cosmarium* est une Desmidiacée placoderme unicellulaire de grande taille d'environ 90 μ de long. Elle présente une constriction médiane au niveau de l'isthme. Le noyau se trouve à ce niveau. (Planche IV, fig. n° 10). Deux chromatophores tapissent presque la totalité de la cellule. On note la présence de quatre importants pyrénoides et les vacuoles n'occupent qu'un volume restreint. La multiplication se fait par division des cellules végétatives. Après division du noyau, les deux hémisomates d'une

cellule s'écartent et régénèrent chacun une nouvelle moitié de cellule. On peut souvent voir dans les cultures, des cellules venant de se diviser encore accolées. Il est aisé d'isoler des cellules et donc d'obtenir des clones. En milieu liquide, la courbe de croissance est difficile à établir à cause de la grande taille des cellules qui sédimentent rapidement et parce que les cellules sont souvent collées sur les parois du verre et rassemblées entre elles par une fine gaine mucilagineuse. Par contre, il est facile de suivre la croissance d'une cellule sur milieu gélosé. Pour cela il suffit d'isoler les cellules une à une à la pipette capillaire sous une loupe binoculaire et de les déposer sur une boîte de Pétri contenant du milieu gélosé. Le rythme des divisions est régulier en phase exponentielle : une cellule se divise en moyenne une fois toutes les soixante heures, tout au moins pendant les 10 jours qui suivent l'isolement.

B. — TECHNIQUE DU DOSAGE.

Pour n'utiliser que de faibles quantités de muscorine, les dosages ont été faits de la façon suivante : onensemence une goutte d'une culture de *Cosmarium* établie en milieu liquide (L+C), contenant 50 à 60 cellules dans 0,4 cm³ de muscorine contenue dans une petite chambre faite d'un anneau de verre collé sur une lame. Les cellules du *Cosmarium* sont ensuite reprises et après lavage sur lame ensemencées une à une sur milieu gélosé en boîte de Pétri. Les boîtes de Pétri sont exposées à la lumière. On observe après quelques jours s'il y a eu multiplication. Lorsque l'action nocive n'est pas suffisante pour empêcher celle-ci, on peut compter le nombre de cellules de chacune des colonies.

C. — ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS SUR LE DOSAGE.

La présence, dans les filtrats bruts, de certains éléments nutritifs à des concentrations inhabituelles, le temps de contact, l'âge des cellules du *Cosmarium*, la présence ou l'absence de lumière, pouvaient faire varier les résultats du dosage. J'ai donc étudié l'influence de ces divers facteurs.

a) *Concentration en éléments nutritifs* : Lorsqu'on introduit les cellules du *Cosmarium* dans des filtrats non concentrés, provenant de cultures âgées de *Nostoc*, ceux-ci peuvent présenter un épuisement en certains éléments nutritifs.

L'action nocive observée n'est pas due à une carence en éléments nutritifs : des cellules de *Cosmarium* ayant séjourné dans des milieux dilués (milieu *Chu* dilué 2 et 10 fois) se multiplient comme les cellules de la culture témoin.

On a de même vérifié que la concentration trop forte en certains éléments n'était pas la cause de l'action toxique. Le milieu

Chu, employé à des concentrations 2, 5 et 10 fois supérieures à celles du milieu habituel, n'exerce aucune action nocive : la multiplication est normale après repiquage. D'ailleurs, nous avons déjà pu observer que certains filtrats, après réduction de volume de 20 fois (concentration « 20 »), sont dépourvus de toute activité sur *Cosmarium*. D'autre part, les dilutions des filtrats concentrés ont été réalisées : les unes, avec de l'eau bidistillée ; les autres, avec du milieu *Chu*. Les résultats ont été les mêmes dans les deux cas ; dans les expériences ultérieures, toutes les dilutions ont été faites avec le milieu *Chu*.

b) *Variation du temps de contact du Cosmarium avec la muscorine* : Pour la recherche de la dilution limite entraînant l'arrêt de la multiplication de toutes les cellules, il fallait savoir quel était le temps de contact nécessaire. Les cellules ont été introduites dans diverses dilutions d'une même muscorine et reprises après des temps de contact variables. Les résultats obtenus pour plusieurs de ces dosages sont consignés dans le tableau IX.

Dans ce tableau : *E* représente le nombre de cellules examinées ; *R* le nombre de cellules vivantes comptées en tout sur les boîtes après 3 ou 7 jours. Lorsque toutes les cellules ont été trouvées mortes, on a noté zéro. Lorsqu'une partie des cellules étaient mortes, celles-ci ont été comptées séparément et marquées *m*. *N* est le nombre de cellules de chaque clone en tenant compte seulement des cellules restées vivantes. Les chiffres ont été obtenus par l'examen des boîtes de Pétri 5 jours après transfert des cellules.

Pour les tableaux suivants, la nomenclature utilisée est la même. Le temps après lequel les comptages ont été effectués est indiqué pour chacun des cas.

D'après ces résultats, on peut voir que, par exemple, dans le cas de la muscorine N° 40, l'action nocive ne semble pas s'exercer après 1 h. 30 de contact. Après 8 heures, on observe la mortalité de toutes les cellules seulement pour la dose la plus forte : « 10 ». Après 23 heures, l'effet létal se manifeste également pour la dilution « 5 ». Après 33 et 120 heures de contact, les résultats ne changent plus. Les dilutions dans lesquelles les Algues sont restées vivantes et capables de se diviser après 23 heures sont toujours dépourvues d'activité après 120 heures de contact. On remarquera toutefois que pour la dilution « 2 », le rythme de division n'est pas égal à celui du témoin. 23 heures de contact ont suffi dans ce cas pour obtenir l'effet de toxicité maximum. Pour la muscorine n° 70 on observe que l'activité inhibitrice ne s'exerce pas complètement après 10 heures (il reste des cellules vivantes à la dilution « 5 »), mais elle est totale après 24 heures. On peut noter qu'après des temps de contact courts, 1 et 10 heures, les

TABLEAU IX

Action de la muscorine n° 10 à diverses dilutions sur les cellules du *Cosmarium* après des temps de contact variables.

Dilution de la muscorine en unités de concentration	Après 1 h 30 de contact			Après 8 heures de contact			Après 23 heures de contact			Après 33 heures de contact			Après 120 heures de contact		
	E	R	N	E	R	N	E	R	N	E	R	N	E	R	N
Témoin milieu Chu															
« 10 »	6	18	8	6	48	8	12	59	5	11	80	7	5	112	22
« 5 »	6	41	7	12	0	0	10	0	0	10	0	0			
« 2 »	12	92	8	13	34	2,5	13	0	0	14	0	0			
« 1 »	8	55	7	12	38	3	12	5 ^m 20	3	8	5 ^m 6	2	3	36	12
« 0,5 »	12	103	9	14	65	5	13	2 ^m 17	4	2 ^m 12	26	2,6	7	144	20
	16	122	8	11	47	1	6	1 ^m 27	5	9	35	1			

TABLEAU X
Action de la muscorine n° 70 à diverses dilutions sur les cellules de *Cosmarium* après des temps de contact variables (lecture après 7 jours).

Dilution de la muscorine en unités de concentration	Après 4 heures			Après 10 heures			Après 24 heures		
	E	R	N	E	R	N	E	R	N
Témoin	10	^{2m} 97	12	9	59	6,5	9	233	25
« 20 »	5	^{2m} 8	2	5	0	0	3	0	0
« 10 »	12	60	5	7	0	0	8	0	0
« 5 »	15	^{2m} 56	4	6	21	3,5	12	0	0
« 2 »	11	42	4	3	^{2m} 6	6	7	^{5m} 6	3
« 1 »	6	24	4	7	40	5	5	101	20
« 0,50 »	4	44	11	6	26	4			

TABLEAU N1
Influence de la lumière sur l'action de la muscorine. (Muscorine n° 40 et 60, Temps de contact : 24 heures à 27°C.

Dilution de la muscorine en unités de concentration	Muscorine n° 40						Muscorine n° 60					
	Lumière			Obscurité			Lumière			Obscurité		
	E	R	N	E	R	N	E	R	N	E	R	N
Témoin	12	59	5	9	36	1	11	59	5	10	12	1
α 10 ⁻⁴	10	0	0	10	0	0	12	0	0	9	0	0
α 5 ⁻⁴	13	0	0	6	0	0	8	0	0	15	0	0
α 2 ⁻⁴	12	5 ^m 20	3	8	16	2	9	0	0	8	0	0
α 1 ⁻⁴	13	2 ^m 38	5	11	30	3	10	1 ^m 23	2,5	12	31	3
α 0.5 ⁻⁴	6	1 ^m 27	5	12	60	5	13	53	4	8	24	3

cellules survivent à des dilutions exerçant une action létale sur la totalité des cellules après des temps de contact plus longs, mais leur rythme de division est inférieur à celui du témoin. Après 24 heures de contact, l'effet létal s'exerce jusqu'à la dilution « 5 ».

J'ai pu observer, dans de nombreuses autres expériences, que la prolongation du temps de contact de 24 à 48 heures, ou à 75 heures, n'apporte aucun changement au résultat obtenu. Le temps de contact minimum nécessaire pour obtenir la manifestation complète de l'effet létal est d'au moins 24 heures. Pour les dosages ultérieurs, pour ne pas avoir de variations, les cellules ont été laissées en contact, pendant 48 heures, avec les muscorines à étudier avant d'être transférées sur milieu gélosé.

c) *Influence de la lumière* : L'Algue utilisée pour les épreuves d'activité de la muscorine est un organisme qui, dans les conditions normales, utilise l'énergie lumineuse pour la photosynthèse. Dans certains cas, l'action de substances toxiques s'exerce plus fortement en présence de lumière qu'à l'obscurité. Il était possible que l'absence de lumière pendant le temps de contact avec la muscorine modifie les résultats obtenus. Quelques expériences ont été effectuées simultanément à la lumière et à l'obscurité à 27°C. Les résultats de ces expériences sont résumés dans le tableau XI.

L'action de la muscorine s'exerce à la lumière comme à l'obscurité, peut-être légèrement moins vite dans ce dernier cas. L'action nocive n'est donc certainement pas due à une action primaire sur le mécanisme de photosynthèse.

J'ai donc adopté dans la suite de ce travail la méthode de dosage suivante :

Une cinquantaine de cellules de *Cosmarium*, venant d'une culture âgée de 10 à 20 jours sont laissées en contact, pendant 48 heures, avec la muscorine, à soumettre à l'épreuve d'activité biologique.

Quelques-unes d'entre elles sont transférées ensuite une à une sur milieu gélosé en boîtes de Pétri. La lecture des boîtes est faite 7 jours après ce transfert. La dernière dilution provoquant la mort de toutes les cellules est celle utilisée pour exprimer l'activité de la muscorine étudiée. L'épreuve est faite dans une pièce à température constante à 27°C recevant un éclairage de 2200 Lux pendant 17 heures sur 24. Les cultures de *Cosmarium Lundellii* utilisées au cours de ce travail proviennent initialement d'un seul clone de cet organisme.

II. — ACTION SUR *COSMARIUM LUNDELLII*

A. — SUR LA VITESSE DE MULTIPLICATION.

Dans ce qui précède nous avons vu que l'action de la muscorine peut se manifester de diverses façons sur *Cosmarium*. Elle peut n'exercer aucun effet sur la croissance de celui-ci, la ralentir ou l'inhiber complètement. C'est pour mieux connaître les conditions et les limites d'action, pour chacun des cas, que j'ai étudié l'activité de quelques filtrats bruts, puis celle du produit purifié, en utilisant la méthode de dosage décrite.

a) *Filtrats bruts.*

Les résultats obtenus pour quelques-unes des muscorines étudiées ont déjà été donnés dans le paragraphe précédent. En examinant les chiffres obtenus pour la descendance individuelle de chacune des cellules et en les groupant par classes, on peut s'assurer que l'abaissement du taux de multiplication est réel et que les différences obtenues entre les moyennes pour la descendance des témoins et certaines dilutions de muscorine, sont statistiquement significatives. Les résultats obtenus pour deux de ces expériences sont consignés dans le tableau XII.

On peut voir que, pour la muscorine n° 40, la différence évidente entre témoin et dilution « 2 », ne l'est plus pour « 1 ». Le calcul montre qu'elle est tout de même significative. Pour la muscorine n° 600, la différence entre « 2 » et le témoin est également significative. Dans tous les cas, les calculs ont été faits pour les cas extrêmes.

En conséquence, suivant la dose de muscorine, les effets sont à classer en trois zones différentes :

1) Une zone d'inactivité pour les faibles doses. La croissance et l'aspect des cellules sont normaux.

2) Une zone d'activité sublétales, relativement étroite. La majorité des cellules reste vivante et présente un aspect normal, mais leur vitesse de multiplication est nettement ralentie.

3) Une zone d'activité létale pour les fortes doses. Toutes les cellules présentent un aspect anormal, sont incapables de se diviser et meurent à plus ou moins brève échéance.

b) *Produit purifié.*

A partir du moment où l'extraction de la fraction active a été possible, des dosages quantitatifs ont pu être effectués par le dosage d'activité sur *Cosmarium* selon la méthode habituelle.

On a comparé, dans chacun des cas, l'activité des extraits à ceux des filtrats bruts en indiquant : d'une part, le poids d'extrait utilisé ; et, d'autre part, la dilution correspondante par rapport

TABEAU XII
Action des muscorines n°s 40 et 600 sur la vitesse de multiplication du *Cosmarium*

Dilutions en unités de concentra- tion	Muscorine n° 40			Muscorine n° 600		
	Nombre de cellules ensemencées	Nombre de cellules issues de chacune d'elles	Nombre moyen de cellules issues d'une seule	Nombre de cellules issues de chacune d'elles	Nombre de cellules ensemencées	Nombre moyen de cellules issues d'une seule
Témoin	4 3 3 2	4 + 4 + 4 + 6 4 + 4 + 6 4 + 4 + 7 5 + 7	4,9	4 8 + 8 + 4 4 + 8 + 8 13 + 17 + 11 + 11	1 3 3 1	0
" 20				m	10	0
" 10 "	9	m	0	m	19	0
" 5 "	13	m	0	m	18	0
" 2 "	2 3 2 5	1 + 4 4 + 2 + 2 m 4m + 4	3	7 4 + 4 + 4 11 + 9 + 6 4 + 4 + 4	1 3 3 3	5,5
" 1 "	5 4 2 2	2m + 4 + 4 + 4 4 + 5 + 4 + 4 4 + 4 4 + 6	4,2			

(Lecture après 5 jours).

(Lecture après 7 jours)

 $y^2 - \bar{x}' = 0,646$ s 0,174 $\bar{x}' - \bar{y}' = 3,0$ s=0,646

t 4 pour 19 degrés de liberté.

au filtrat brut en unités de « concentration ». Les résultats obtenus pour une de ces muscorines sont donnés dans le tableau XIII.

On peut observer, pour chacune des muscorines étudiées, les trois zones d'activité mentionnées plus haut. On peut voir également que les filtrats bruts exercent leur action à des dilutions plus fortes que les extraits obtenus à partir d'eux. Ceci peut sans doute s'expliquer en admettant que la pénétration de la muscorine dans la cellule se fait bien plus facilement dans ce cas, que dans celui des extraits. En effet, dans les filtrats bruts aqueux, la dispersion de la partie active est parfaite et la cellule se trouve certainement plus facilement en contact avec celle-ci que lorsque les extraits sont remis en suspension imparfaite dans l'eau.

Tous ces résultats ont été comparés dans le tableau XIV, en tenant compte des doses nécessaires dans chacun des cas pour obtenir soit l'effet létal, soit l'effet sublétal ou l'action nulle. Pour les filtrats bruts, les doses sont exprimées d'après les poids correspondants d'extrait obtenu par l'éther éthylique. Pour le filtrat n° 405, ce poids n'était pas connu : les doses sont exprimées par rapport à l'extrait obtenu par l'éther de pétrole.

c) Conclusions.

De tout ceci il ressort :

1) que les divers filtrats bruts présentent des activités variables ;

2) que, pour les extraits, les doses nécessaires pour produire les trois effets cités sont les suivantes :

pour les extraits obtenus par l'éther éthylique :

Effet nul : au-dessous de $1 \text{ à } 3,5 \cdot 10^{-5} \text{ g/cm}^3$

Effet sublétal : de $3 \cdot 10^{-5}$ à $1 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^3$

Effet létal : au-dessus de $1 \text{ ou } 2 \cdot 10^{-5} \text{ g/cm}^3$

pour le produit cristallisé :

Effet nul : au-dessous de $1 \cdot 10^{-6} \text{ g/cm}^3$

Effet sublétal : de $1 \cdot 10^{-5}$ à $1 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^3$

Effet létal : au-dessus de $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ g/cm}^3$

Les doses de produit cristallisé, nécessaires pour exercer un même effet sur *Cosmarium* sont environ 10 fois moindres que celles de l'extrait obtenu par l'éther éthylique. Or, à partir d'une même quantité de filtrat brut, le poids de muscorine obtenu à l'état cristallisé n'est que 4 fois moindre que celui de l'extrait obtenu par l'éther éthylique. La meilleure purification du produit cristallisé a pour effet une augmentation de l'activité biologique.

En résumé, la muscorine à l'état brut ou purifié exerce à la lumière comme à l'obscurité, une action létale sur la cellule du *Cosmarium*, après des temps de contact courts (3 à 18 heures).

TABLEAU XIII

Dosage de l'activité sur *Cosmarium* de la muscorine n° 904 : (1) après extraction par l'éther éthylique ; (2) après extraction par l'éther éthylique ; (3) après extraction par l'éther de pétrole et cristallisation.

Poids utilisés en g/cm ³ et unités de concentration correspondantes	(1) Extrait obtenu par l'éther éthylique			(2) Filtrat brut			(3) Muscorine cristallisée			
	E	R	N	E	R	N	Poids en g/cm ³	E	R	N
Témoin.....	15	107	7							
2,7.10 ⁻⁴ (« 80 »)	21	0	0				1,25.10 ⁻⁴	29	0	0
7. 10 ⁻⁵ (« 20 »)	32	17 ^m	6	34	0	0	3. 10 ⁻⁵	18	0	0
3,5.10 ⁻⁵	25	163	8	58	0	0	1,5.10 ⁻⁵	34	0	0
1,7.10 ⁻⁵ (« 5 »)	38	260	7	38	0	0	7,5.10 ⁻⁶	18	15 ^m 14	4,4
8,5.10 ⁻⁶	38	7 ^m 186	6	22	0	0	3. 10 ⁻⁶	18	2 ^m 98	6
4,2.10 ⁻⁶	20	143	7	27	0	0	1,5.10 ⁻⁶	27	6 ^m 137	6

TABLEAU NIV

Comparaison pour plusieurs filtrats des doses nécessaires en g/cm³ du produit brut, purifié ou cristallisé pour obtenir les différentes zones d'activité.

	Muscorine utilisée	Zone d'inactivité	Zone d'action sublétale	Zone d'action létale
Filtrats bruts	N° 100	4. 10 ⁻⁶	8. 10 ⁻⁶	1,6.10 ⁻⁵
	N° 165	1,2.10 ⁻⁵	—	6. 10 ⁻⁵
	N° 405	(4. 10 ⁻⁷)	(4 à 8. 10 ⁻⁷)	(1,6.10 ⁻⁶)
	Par rapport à l'éther de pétrole			
	N° 904	4,2.10 ⁻⁶	—	4,2.10 ⁻⁶
Extrait obtenu par l'éther éthylque	N° 100	1. 10 ⁻⁵	2,5 à 5.10 ⁻⁵	1. 10 ⁻⁴
	N° 165	1,2.10 ⁻⁵	6. 10 ⁻⁵	1,2.10 ⁻⁴
	N° 904	3,5.10 ⁻⁵	—	2,7.10 ⁻⁴
Muscorine cristallisée	N° 405	8. 10 ⁻⁷	1,6 à 4.10 ⁻⁶	1,6.10 ⁻⁵
	N° 904	1,5.10 ⁻⁶	7,5.10 ⁻⁶	1,5.10 ⁻⁵

Pour certaines doses critiques après 24 heures de contact, et quel que soit le temps pendant lequel on prolonge ce contact, on observe un ralentissement de la vitesse de multiplication. Pour les doses plus fortes, on obtient ce même ralentissement pour des temps de contact très courts, de 2 à 10 heures, mais ici la prolongation du contact entraîne la mort des cellules. Enfin, pour les faibles doses, on n'observe aucun effet. La nature du mécanisme en jeu ne nous est pas connue, mais quelques observations cytologiques, décrites dans ce qui suit, permettent de connaître un peu mieux les manifestations de l'action toxique.

B. — SUR LA CYTOLOGIE DE LA CELLULE PENDANT LE CONTACT AVEC LA MUSCORINE.

Lorsqu'une cellule de *Cosmarium* est introduite dans une solution de muscorine, son aspect reste normal si les doses utilisées sont faibles et exercent un effet nul ou sublétal. Aux doses plus fortes, qui entraînent plus ou moins rapidement la mort de toutes les cellules, l'examen microscopique permet d'observer des modifications cytologiques importantes.

Les figures de la planche IV représentent les divers aspects d'une cellule de *Cosmarium* au cours des 48 heures qui suivent l'introduction dans une solution de muscorine à une dose provoquant la mort des cellules après ce temps (muscorine n° 600, concentration « 5 »).

La fig. 10 représente l'aspect typique des cellules du *Cosmarium*.

Après 5 heures de contact avec la muscorine, on peut déjà observer une très forte vacuolisation de la cellule et un début de rétraction du chromatophore (fig. 11).

Après 24 heures de contact (fig. 12 et 13), la vacuolisation est devenue très importante et la presque totalité de la cellule est occupée par les vacuoles. A ce moment, le cytoplasme est très vésiculeux, le chromatophore est rétracté et rabattu contre les pyrénoides et on remarque une très importante accumulation de corpuscules trépidants, petits globules agités de mouvements browniens, localisés à l'intérieur des vacuoles et plus denses que le suc vacuolaire qui les contient. Ces corpuscules existent également dans les cellules normales et dans les cellules venant de se diviser, mais en nombre beaucoup plus faible. Ils sont solubles dans le suc vacuolaire à la mort de la cellule et sont difficiles à mettre en évidence autrement que par l'examen direct sur le vivant. WEST (1912) les considère comme la conséquence d'un état pathologique de la cellule et les nomme « Zersetzungskörperchen », mais KOPETZKY-RECHTERG (1931) les caractérise comme des matières de réserve. D'après ce dernier auteur, ce sont des

constituants normaux de la cellule de *Cosmarium* et leur présence ou leur absence ne serait que le reflet d'un équilibre ou d'un déséquilibre entre la vitesse de division et la faculté d'assimilation de la cellule, conditionné par les facteurs biologiques externes. LEFEVRE (1935) arrive à la même conclusion. Par ailleurs, on sait aussi que la photosynthèse n'est pas indispensable à leur élaboration.

Leur abondance et leur multiplication rapide, sous l'effet de la muscorine, sont certainement le signe d'un métabolisme pathologique. La cellule présente un métabolisme de l'eau anormal. L'accumulation de ces corpuscules peut s'expliquer si on admet que, dans ces cellules, l'assimilation continue mais que l'eau n'est plus disponible dans le protoplasme. D'après les études de COLLYER et FOGG (1955) on sait que, chez les Algues, l'accumulation de lipides est favorisée alors. A ce moment, les cellules transférées sur milieu gélosé neuf, ne peuvent déjà plus se diviser. La modification est irréversible.

Enfin, après 48 heures de contact (fig. 14 et 15), les cellules sont complètement vésiculisées. Les vacuoles occupent à peu près toute la cellule. Les corpuscules trépidants ont disparu. Le chromatophore est rabattu sur les pyrénoides et ceux-ci sont les seuls organites cellulaires encore visibles. A ce stade, lorsqu'on fait une coloration avec une solution de Lugol, on constate que les réserves d'amidon ont disparu : aucune coloration bleue n'apparaît autour des pyrénoides.

L'action toxique de la muscorine s'exerce donc en s'accompagnant rapidement de modifications du métabolisme de la cellule. Il semble qu'au début il y ait un changement important du métabolisme de l'eau, se traduisant par une forte absorption : la cellule se vacuolise. Ceci rappelle ce qui a été observé par BACHMANN (1956) pour l'action de l'acide fusarique sur la cellule de *Spirogyra* : l'action toxique se traduit par une forte augmentation de la perméabilité à l'eau de la cellule. Par ailleurs, dans notre cas, les processus d'assimilation ne sont pas tous bloqués, du moins pour les contacts de durée brève avec la muscorine, mais la multiplication cellulaire ne peut plus avoir lieu. Nous discuterons plus loin la signification de ces phénomènes.

III. — ACTION SUR D'AUTRES ALGUES

Nous savons que *Cosmarium* n'est pas la seule Algue sensible à l'action de la muscorine et nous avons étudié ici brièvement l'action sur quelques autres espèces.

A. — SUR *Nostoc muscorum*.

Des filaments de *Nostoc* provenant de cultures de différents âges, ont été mis en contact avec des solutions de muscorine à diverses concentrations puis repris après 48 heures de contact et repiqués sur milieu *Chu* gélosé. Des filaments pris dans des cultures âgées respectivement de 3 et 6 semaines et de 3 mois ont été ainsi examinés. Tous les filaments repris après 48 heures de contact présentent, une dizaine de jours après le transfert sur milieu gélosé, une bonne croissance. Il n'y a pas d'auto-inhibition du *Nostoc* par ses propres filtrats, du moins dans ces conditions. Les filaments présentent un aspect normal à l'examen microscopique.

La muscorine n'exerce pas non plus d'action inhibitrice sur la croissance du *Nostoc* souche ALLISON. Mentionnons ici qu'il n'y a pas d'effet d'incompatibilité entre la souche d'ALLISON et celle utilisée pour ce travail. Si on ensemence des filaments de ces deux souches en deux points différents d'une boîte de Pétri contenant du milieu gélosé, les filaments ne présentent aucune particularité au moment de leur rencontre. Lorsque la croissance progresse, il est impossible de distinguer les filaments des deux origines.

B. — SUR *Phormidium uncinatum*.

Phormidium uncinatum se classe parmi les Algues les plus sensibles à l'action nocive de la muscorine. Celle-ci provoque la mort du *Phormidium* dans la plupart des cas après contact de 18 heures. Après repiquage, on n'obtient plus de multiplication. Aux faibles doses, les cellules présentent un aspect anormal. Les filaments sont légèrement distendus et gonflés ; ceci est surtout visible pour les cellules se trouvant à l'extrémité antérieure du filament.

C. — SUR *Euglena mutabilis*.

Les cellules de cette Algue ayant séjourné dans les solutions de muscorine meurent dans la plupart des cas. Dans une cellule normale, le chromatophore occupe toute la partie postérieure de la cellule. Celle-ci contient de nombreux grains de paramylon et un stigma bien visible à sa partie antérieure. La cellule est très mobile. Après 12 heures de contact avec la muscorine, les chromatophores sont rétractés ; seule la partie postérieure de la cellule est colorée en vert. Les grains de paramylon sont très apparents et le stigma est rétracté. La cellule ne présente plus que de faibles mouvements de métabolie. Après 24 heures de contact avec la muscorine, la cellule s'allonge et est bourrée de grains de paramylon gros et très réfringents. Le stigma est en voie de désin-

légation et est réduit à l'état de granules rouges dispersés dans le cytoplasme. La cellule est immobile et meurt après 18 heures de contact avec la muscorine. Le stigma n'est plus visible ; les grains de paramylon sont gros, nombreux et extrêmement réfringents. Le chromatophore est réduit à l'état de masse ronde, vert-pâle et occupe un faible volume.

D'après les études de PRINGSHEIM (1952) sur l'obtention, par l'action de la chaleur et de la streptomycine, de souches d'Euglènes apoplastidiées, on sait qu'on peut distinguer, parmi les Euglènes, plusieurs groupes : celui qui comprend les Euglènes où la disparition du chromatophore entraîne obligatoirement la disparition du stigma, celui où cette disparition simultanée n'est pas absolue et celui où les deux organites sont indépendants.

Dans le cas présent et pour l'Euglène que nous avons choisie, on voit que l'action sur le chromatophore entraîne aussi la disparition du stigma.

IV. — ACTION SUR UNE LEVURE DE BOULANGERIE : *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Quelques expériences ont été faites pour étudier l'action de la muscorine sur une Levure de boulangerie. La souche de levure utilisée est une Levure diploïde isolée par Mme L. GOLDSTEIN.

Toutes les cultures ont été faites de la façon suivante :

On a opéré, en milieu liquide, dans des fioles d'Erlenmeyer de 50 cm³ contenant 10 cm³ de milieu synthétique (1). Les cellules inoculées provenaient pour toutes les expériences, de cultures en milieu synthétique liquide, se trouvant en phase exponentielle de croissance. Toutes les cultures ont été incubées à 26°C.

Les comptages ont été effectués par étalement sur boîtes de Pétri. Pour cela les cultures sont diluées de façon qu'il y ait environ 100 colonies par boîte. Les chiffres donnés sont en général les moyennes de 4 comptages. Le milieu d'étalement utilisé avait la composition suivante : « Yeast-extract » (Difco) : 0,5 % ; glucose : 2 % ; agar-agar en branches : 2 %.

Lorsqu'on introduit des cellules de la Levure étudiée dans des solutions de muscorine (filtrats bruts ou produit purifié) on peut observer que, suivant la dose utilisée et le temps de contact, l'action de celles-ci se manifeste, comme pour *Cosmarium*, de diverses manières. Elles peuvent être inactives ou au contraire exercer une action létale sur une partie, ou sur la totalité des cel-

(1) Composition du milieu synthétique : SO₄Mg, 7H₂O : 0,7 g ; PO₄H₂K : 1 g ; ClNa : 0,5 g ; CaCl₂ : 0,4 g ; SO₄(NH₄)₂ : 1,2 g ; Cl₃Fe : solution à 1 %, 0,5 cm³ ; glucose : 20 g ; H₂O q.s. 900 cm³ ; Tampon au citrate de Na M/2 pH = 5,2, 100 cm³.

lules ensemencées. Lorsque la dose est telle qu'elle provoque seulement la mort d'une partie des cellules, on observe l'apparition d'une proportion très élevée de mutants « petite colonie », alors que, dans le témoin celle-ci, est très faible.

Cette mutation a été étudiée en détail par EPHRUSSI et ses collaborateurs (1949). On sait que ces Levures présentent des déficiences du système enzymatique respiratoire. Elles ne peuvent croître en utilisant le sucre par respiration, mais l'utilisent seulement par fermentation. Etant donné que du point de vue du rendement énergétique ce dernier processus est peu efficace, leur croissance est limitée en présence d'une quantité donnée de sucre. Plusieurs procédés ont été utilisés par ces auteurs pour mettre en évidence les déficiences enzymatiques. Nous n'en avons utilisé qu'un seul, pour nous assurer que les colonies « petites » observées présentaient bien ces déficiences : celui de la réaction du « Nadi ». En présence de la Levure normale, cette réaction est positive et se traduit par une forte coloration bleue. Elle est négative pour la Levure mutante et on n'observe aucune coloration. Les « petites » dans notre cas étaient bien Nadi-négatives.

Nous ne rapporterons ici que les résultats obtenus pour deux des filtrats bruts étudiés. Ils sont consignés dans le tableau XV.

Dans les deux cas on peut observer que le témoin présente une multiplication normale et que le temps de génération est d'environ 3 heures dans ces conditions expérimentales. Le pourcentage de « petites » est très faible $\leq 1\%$ et ne subit pas de variation au cours de l'évolution de la culture.

Les faibles dilutions (unités de concentration « 10 » et « 5 ») entraînent, dans les deux cas, la mort des cellules, sans changer notablement le pourcentage de « petites ».

Pour les fortes dilutions (unités de concentration « 2 ») une faible partie seulement des cellules survit et la proportion de « petites » augmente au cours du temps et atteint 100% pour les temps de contact longs. Pour la muscorine n° 40 ce sont ces mêmes dilutions qui provoquaient la mort d'une partie des cellules et le ralentissement de la cadence de multiplication des cellules restées vivantes.

Enfin, pour des dilutions encore plus grandes (unités de concentration « 0,4 ») la muscorine n° 40 provoque encore un fort retard de croissance par rapport au témoin. Le pourcentage de « petites » ne semble pas varier et reste $\leq 1\%$.

Si on examine avec cette même muscorine ce qui se passe pour les contacts de durée brève, on obtient les résultats consignés dans le tableau XVI.

On peut voir que :

TABLEAU NV

Action de la muscorine n° 114 sur la Levure. Action des diverses dilutions sur le nombre de colonies et le pourcentage de « petites » au cours du temps. (N) = nombre de cellules par $0,1 \text{ cm}^3$, %p = % « petites ».

Dilution en unités de concentration	A l'ensemencement		Après 15 h		Après 47 h		Après 4 jours	
	(N)	%p	(N)	%p	(N)	%p	(N)	%p
Témoin.....	7250	1 %	385 000	1 %	2 500 000	1 %		
« 10 ».....			3	—	1	—		
« 5 ».....			16	—	5			
« 2 ».....			71	—	172	62 %	13 000	100 %

Action de la muscorine n° 40

Dilution en unités de concentration	A l'ensemencement		Après 24 heures		Après 48 heures		Après 6 jours	
	(N)	%p	(N)	%p	(N)	%p	(N)	%p
Témoin.....	536	1 %	244 000	1 %	2 800 000	1 %		
« 10 ».....			3	—	0		0	
« 1 ».....			153	1,4 %	88	9 %	13	—
« 2 ».....			299	72 %	237	94 %	250	100 %
« 0,1 ».....			10 800	1 %	8 600	1 %	25 400	

TABLEAU XVI

Action de la muscorine n° 40 en fonction du temps de contact :

1) Sur la croissance (nombre de colonies par 0,1 cm³)

2) Sur l'apparition de mutants « petites colonies »

Dilution en unités de concentration	Ensemencement	Après 3 h	Après 8 h.	Après 12 h	Après 14 h 30	Après 24 h	Après 33 h	Après 57 h
Témoin (1).	790	1240	2280	3828	4550	50 000	242 500	
« 10 » (1)...	970	1240	65	26	40	35	12	
« 2 » (1)....	955	910	900	172	930	171	22	
Témoin (2)...	≥ 1 %	≤ 1 %	≤ 1 %	≤ 1 %	≤ 1 %	≤ 1 %	≤ 1 %	
« 10 » (2)...	≥ 1 %	≤ 1 %	3 %	5 %	4 %	1 %	1 %	
« 2 » (2)....	≥ 1 % c	≤ 1 %	≤ 1 %	≤ 1 %	1 %	32 %	69 %	74 %

a) pour les faibles dilutions, la mort des cellules intervient très rapidement : après 3 heures, la plupart d'entre elles sont mortes. Après 33 heures, seules quelques rares cellules sont restées vivantes. Ce sont des cellules normales. Dans d'autres expériences on a souvent trouvé que la totalité des cellules étaient mortes.

b) pour les fortes dilutions, l'augmentation de la proportion des « petites » n'est observée qu'après 24 heures de contact, temps après lequel le nombre de cellules vivantes dans la culture diminue. Le pourcentage de « petites » augmente ensuite si on prolonge le temps de contact.

On pouvait penser qu'il s'agissait, dans ce cas, d'une sélection des « petites » qui seraient seules capables de survivre et de se multiplier, alors que les cellules normales meurent. Il ne semble pas en être ainsi. Lorsqu'on ensemence des cellules de cultures de clones de « petites » de cette souche dans diverses muscorines, elles sont incapables de se multiplier et meurent de la même façon que les Levures normales de cette souche.

On est par conséquent conduit à admettre que pour les concentrations critiques, les cellules encore capables de se diviser engendrent, dans la plupart des cas des « petites ».

Nous avons observé ces effets avec de nombreux autres filtrats, mais quelquefois il a été difficile de fixer exactement la dilution voulue pour obtenir une proportion très élevée de cellules mutantes.

Les résultats de l'action de la muscorine sur *Saccharomyces* peuvent être comparés à ceux obtenus avec *Cosmarium*. En effet ici aussi, on peut délimiter plusieurs niveaux d'activité.

1) Pour les faibles doses l'action est nulle.

2) Pour des doses légèrement plus élevées, on observe simplement un retard de croissance par rapport au témoin.

3) Pour des doses critiques, plus élevées encore, ne couvrant qu'une zone étroite, une partie des cellules meurt alors que parmi celles qui sont trouvées vivantes on voit apparaître une forte proportion de « petites ». Celle-ci augmente en fonction de la durée du contact avec la muscorine.

4) Pour les doses très fortes l'action est létale. Cette action peut être rapide et se faire déjà sentir après 3 heures. Nous avons vérifié qu'elle n'est pas due à l'introduction d'éléments toxiques pour la Levure, provenant par exemple des éléments du milieu *Chu* ; et, d'autre part, certaines muscorines inactives, préparées exactement de la même façon que les échantillons actifs permettaient une croissance de la Levure tout à fait comparable à celle du témoin. D'autre part, nous avons également vérifié que le pH pour

les diverses dilutions se trouvait dans des limites permettant une bonne croissance de la Levure.

Mentionnons ici le fait que, seules, les muscorines actives sur *Cosmarium*, l'étaient aussi sur la Levure et que les muscorines très actives sur *Cosmarium*, c'est-à-dire ne permettant la multiplication normale de cet organisme que pour les fortes dilutions, étaient également très actives sur la Levure. Les doses à utiliser pour obtenir les divers effets sur *Saccharomyces* étaient comparables à celles à utiliser pour l'Algue.

La muscorine à l'état cristallisé exerce, sur la Levure, les mêmes effets que les filtrats bruts. C'est la même substance qui agit comme inhibiteur de la croissance pour *Cosmarium* et pour *Saccharomyces*. En outre, elle exerce une action mutagène sur la Levure.

V. — DISCUSSION

La muscorine, corps à structure d'anthraquinone, se rapprochant du groupe de l'helminthosporine, exerce une action antibiotique, non seulement sur certaines Algues mais aussi sur des Bactéries et sur une Levure. Son action se manifeste par un bouleversement profond de la physiologie de la cellule, se traduisant par des modifications morphologiques et cytologiques. L'effet toxique interfère avec le processus de croissance, mais nous ne savons pas actuellement si les mécanismes primaires touchés pour les divers organismes étudiés sont les mêmes dans tous les cas ou s'ils sont de différents types.

Pour un même organisme, les effets varient suivant la dose utilisée et on assiste à une altération immédiate ou graduelle des processus métaboliques.

Nous avons montré que, pour *Cosmarium*, l'action toxique n'est pas liée de façon primaire au mécanisme de photosynthèse. L'effet toxique de la muscorine se manifeste par une interférence plus ou moins poussée avec les processus de la croissance. On observe, en plus de l'effet létal, toute une gamme d'effets intermédiaires, depuis le simple retard de croissance jusqu'au ralentissement de la vitesse de multiplication. L'accumulation de corpuscules trépidants dans la cellule révèle que les processus d'assimilation ne sont pas encore arrêtés, alors que la division cellulaire l'est déjà de façon irréversible. Pour cet organisme, la première manifestation de l'action toxique est une modification de la perméabilité à l'eau se traduisant par une forte absorption, qui a lieu avant l'apparition des symptômes pathologiques. Ces modifications sont à rapprocher de celles qu'a observées BACHMANN (1956) pour l'action de l'acide fusarique sur la cellule de *Spirogyra*. Sous l'effet

de cette toxine on assiste à une augmentation rapide de la perméabilité à l'eau de la cellule. L'auteur a pu montrer que divers systèmes enzymatiques sont touchés : celui des phosphorylations oxydatives et celui de la cytochrome-oxydase.

Pour les autres Algues sur lesquelles la muscorine exerce un effet toxique, on a pu observer avant la mort et la désorganisation de la cellule un gonflement et une élongation de celle-ci : en particulier pour *Phormidium uncinatum* et pour *Euglena mutabilis*.

Pour l'action sur la Levure, nous pouvons distinguer entre action toxique et action mutagène. Dans ce dernier cas nous savons que les cellules formées présentent des déficiences des systèmes enzymatiques respiratoires, en particulier l'absence de cytochrome-oxydase.

Nous ne savons pas actuellement si l'action sur *Cosmarium* et sur la Levure est due à une même cause. Nous pouvons simplement dire que les doses nécessaires pour provoquer le ralentissement de la vitesse de multiplication du *Cosmarium* et, chez la levure, la mort d'un grand nombre de cellules et l'apparition de mutants présentant des déficiences des enzymes respiratoires, sont comparables.

Par ailleurs, l'existence de produits du métabolisme intra-ou extracellulaires, présentant une structure d'antraquinone, n'a pas encore été signalée, à ma connaissance, chez les Algues. Par contre, on sait que de telles substances sont fréquemment présentes dans le mycélium des Champignons, dont elles peuvent constituer jusqu'à 30% du poids sec. Leur présence chez les Cyanophycées, ne fait qu'accentuer la position tout à fait particulière de celles-ci parmi les Algues et d'une façon plus générale, parmi les êtres vivants. En effet, la physiologie des Cyanophycées, présente bien des points communs avec celle des Bactéries et des Champignons (FOGG, 1956). Quelques Cyanophycées, parmi lesquelles, celles du genre *Nostoc*, ont en commun avec certaines Bactéries, d'être fixatrices d'azote moléculaire. La libération de polypeptides extra-cellulaires en quantités importantes ne leur est pas particulière ; elle est connue aussi chez les Bactéries et chez les Champignons (MORTON 1955). Elles produisent de l'acide α - ϵ diaminopimélique, en quantités comparables à celles trouvées chez ces organismes (WORK, 1953), alors que la seule autre Algue, une Chlorelle, où la présence de cet acide ait été décelée, n'en contient qu'une quantité infime (FUJIWARA et AKABORI (1954). Leur teneur en vitamine B₁₂ est également supérieure à celle des autres plantes et se rapproche de celle des Bactéries.

Toutes ces particularités font ressortir quelques analogies entre le métabolisme des Cyanophycées et celui des Bactéries et

des Champignons. La muscorine n'est qu'un corps de plus à ajouter à cette liste.

Chez les Champignons, les substances à structure d'anthraquinone sont intracellulaires, alors que, chez *Nostoc muscorum*, il n'a pas été possible de les mettre en évidence dans la cellule même. Les quantités de muscorine produites à l'état extracellulaire, sont bien inférieures à celles trouvées chez les Champignons. Il est pourtant possible que ce soit un même chaînon de processus métaboliques identiques, qui aboutisse à la formation de ces substances chez ces deux groupes d'organismes. La fonction de ces anthraquinones dans le métabolisme de l'Algue, ainsi que dans celui des Champignons, est encore inconnue actuellement.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Nos recherches sur les populations algales de différents sols nous ont conduit à conclure que, dans la nature, les relations de compatibilité, d'antagonisme et d'antibiose entre Algues, sont soumises, comme celles des autres microorganismes, à toute une série d'influences complexes. Pourtant au cours de nos études, nous avons pu observer qu'il existe sûrement des relations d'ordre « biotique » entre certaines espèces. Les Algues, comme beaucoup d'autres microorganismes trouvés dans le sol, produisent des substances antibiotiques.

Dans les cultures brutes d'échantillons de sols, certaines espèces prennent un développement considérable et empêchent celui d'autres espèces. En nous basant sur ces observations, nous avons isolé, en culture unialgale, de nombreuses Algues du sol et nous nous sommes attachée surtout à l'étude de celles qui semblaient exercer l'action inhibitrice la plus énergique sur le développement d'autres espèces. Une de ces Algues, une Cyanophycée, *Nostoc muscorum*, a paru particulièrement intéressante par ses propriétés antibiotiques et son large spectre d'activité.

Les conditions de production, la nature chimique et l'activité biologique de la substance antibiotique en jeu : « la muscorine » ont été étudiées.

La libération maximale de « muscorine » dans le milieu de culture, a été obtenue à 27°C, dans un milieu synthétique inorganique, peu concentré, avec un éclairage intermittent de 2200 Lux et dans des cultures bien aérées.

Il nous a été possible d'isoler au cours de ce travail, la substance douée d'activité antibiotique à l'état cristallisé et son étude chimique a permis de lui attribuer une structure de dihydroxyanthraquinone. La présence de telles substances n'était pas connue jusqu'ici chez les Algues. Leur existence, chez les Cyanophycées, permet quelques rapprochements entre le métabolisme de ces Algues et celui des Bactéries et des Champignons.

Une méthode de dosage biologique de l'activité de la muscorine a été basée sur les doses minimales nécessaires pour provoquer l'inhibition totale de la croissance de l'organisme réactif, une Desmidiée : *Cosmarium Lundellii*. Nous avons pu établir que l'action de la muscorine sur cette Algue, se manifeste suivant la dose uti-

lisée, soit par une inhibition totale de la croissance, soit par un ralentissement de la vitesse de celle-ci. L'action létale est précédée par des modifications rapides du métabolisme de l'eau de la cellule. Avant la mort de la cellule on peut observer que l'assimilation continue, alors que les mécanismes de division sont bloqués. L'action toxique ne semble pas présenter d'interférence primaire avec le mécanisme de la photosynthèse.

La muscorine exerce également son effet antibiotique sur d'autres Algues, sur des *Bactéries Gram (+)*, en particulier sur *Staphylococcus aureus* et sur une *Levure de boulangerie*. Dans ce dernier cas, comme dans celui du *Cosmarium*, nous avons pu observer plusieurs effets, suivant la dose utilisée : l'effet létal, le retard de croissance et, en outre, un effet mutagène. En présence de certaines doses critiques de muscorine, les cellules restées vivantes, encore capables de se diviser n'engendrent plus que des cellules mutantes, présentant des déficiences des systèmes enzymatiques respiratoires. Les doses nécessaires pour entraîner d'une part, le ralentissement de la vitesse de multiplication de l'Algue, d'autre part, l'effet mutagène chez la Levure, sont comparables.

BIBLIOGRAPHIE

- AKEHURST (S.C.), 1931. — Observations on pond life with special reference to the possible swarming of phytoplankton. *J. Roy. Microscop. Soc.* **51**, 237.
- ALLEN (M.B.), 1955. — Excretion of organic compounds by *Chlamydomonas*. *Arch. f. Mikrobiol.* **24**, 163-168.
- ALLISON (F.E.) et MORRIS (M.J.), 1930. — Nitrogen fixation by blue-green algae. *Science*, **71**, 221-223.
- ALLISON (F.E.), HOOVER (S.E.) et MORRIS (H.J.), 1937. — Physiological studies with the nitrogen fixing alga *Nostoc muscorum*. *Bot. Gazette*, **98**, n° 3.
- BEIJERINCK (M.W.), 1890. — Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichengonidien und anderen niederen Algen. *Bot. Zeit.* **48**, 725.
- BIRKINSHAW (J.H.), 1956. — Fungal quinones. In Symposium on antibiotics and mould metabolites ; *The Chemical Society*, London.
- BLINKS (L.R.), 1951. — In Manual of Phycology. *Chronica botanica Co.* 263-291.
- BORNET (E.) et FLAHAUT (Ch.), 1888. — Révision des Nostocacées. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, **7**, 177-262.
- BOYE-PETERSEN (J.), 1935. — Studies on the biology and taxonomy of soil algae. *Dansk. Botanisk. Arkiv.* **8**, N° 9, 1-183.
- BRAARUD (T.), 1930. — Beiträge zur Kenntnis des Stoffwechsels im Meere. *Avhandl. Norske Videnskaps Akad. Oslo*, **14**, 1-24.
- BRENDEMÜHL (I.), 1949. — Über die Verbreitung der Erddiatomeen. *Arch. f. Mikrobiol.* **14**.
- BRISTOL-ROACH (B.M.), 1919. — On the retention of vitality by algae from old stored soils. *New Phytol.* **18**, 29.
- BRISTOL-ROACH (B.M.), 1920. — On the algal flora of some dessicated English soils. *Ann of Bot.* **34**, 35-80.
- BRISTOL-ROACH (B.M.), 1923. — On the carbon nutrition of some algae isolated from soil. *Brit. Assoc. Adv. Sc.* 489.
- BRISTOL-ROACH (B.M.), 1927. — I. On the algae of some normal English soils. *J. of Agric. Sc.* **17**, 563-588.
- BRISTOL-ROACH (B.M.), 1927. — II. On the carbon nutrition of some algae isolated from soil. *Ann. of Bot.* **41**, 509.
- BRISTOL-ROACH (B.M.), 1927. — III. The present position of our knowledge of function of algae in the soil. *Proc. and Papers Ist. Intern. Congr. Soil Sc.*, Washington, **3**, 30-38.
- BRISTOL-ROACH (B.M.), 1928. — On the influence of light and of glucose on the growth of a soil alga. *Ann. of Bot.* **42**, 317.
- COLLYERS (D.M.) et FOGG (G.E.), 1955. — Studies on fat accumulation by algae. *J. of Exp. Bot.* **17**, N° 4, 256-275.

- DE (P.K.), 1939. — The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice fields. *Proc. Roy. Soc. London, B.* **127**, 256-275.
- DENFFER (von D.), 1948. — Über einen Wachstumshemmstoff in alternden Diatomeenkulturen. *Biol. Zbl.* **67**, 7-13.
- DREWESE (K.), 1928. — Über die Assimilation des Luftstickstoffes durch Blaualgen. *Zbl. f. Bakt., Abt II*, **76**, 88.
- EMEIS (C.C.), 1956. — Untersuchungen über die antibakteriellen Eigenschaften der Algen. *Arch. f. Hyg. und Bakteriologie*, N° 8, 140.
- ENGLE (M.B.) et McMURTREY (J.E.), 1940. — Effect of algae in relation to aeration, light and sources of phosphorus on growth of tobacco in solution cultures. *J. Agric. Res. Washington*, **60**, N° 7, 487-501.
- EPHROSSI (B.) et CHIMENES (A.M.), 1949. — Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation « petite colonie ». *Ann. Inst. Pasteur*, **76**, 351.
- ESMARCH (F.), 1914. — Untersuchungen über die Verbreitung der Cyanophyceen auf und in verschiedenen Böden. *Hedwigia*, **4**, 224.
- EYSTER (C.), 1952. — Necessity of boron for *Nostoc muscorum*. *Nature*, **170**, 755.
- FEHER (D.) et FRANK (M.), 1936. — Untersuchungen über die Lichtökologie der Bodenalgen. *Arch. f. Mikrobiologie*, **7**, 1-31.
- FEHER (D.) et FRANK (M.), 1939. — Der unmittelbare Nachweis des autotrophen Algenwachstums beim Ausschluss des sichtbaren Anteils der strahlenden Energie. *Arch. f. Mikrobiologie*, **10**, N° 1.
- FEHER (D.) et KILLIAN (Ch.), 1939. — Recherches sur la microbiologie des sols désertiques. Lechevalier, Paris.
- FELLER (B.), 1948. — Contribution à l'étude du traitement des plaies par un antibiotique dérivé des Algues. *Thèse Vétér.* Paris-Alfort.
- FLINT (L.H.) et MORELAND (L.F.), 1946. — Antibiosis in the blue-green algae. *Amer. J. Bot.* **33**, N° 3, 218.
- FOGG (G.E.), 1949. — Growth and heterocyst production in *Anabaena cylindrica* Lemm. *Ann. Bot. London N.S.* **13**, 241.
- FOGG (G.E.), 1952. — The production of extracellular nitrogenous substances by a blue-green alga. *Proc. Roy. Soc. London B*, **139**, 372-397.
- FOGG (G.E.) et WESTLAKE (D.F.), 1953. — The importance of extracellular products of algae in fresh water. *Trav. Assoc. Intern. Limn.*, 219-232.
- FOGG (G.E.) et WESTLAKE (D.F.), 1956. — The comparative physiology and biochemistry of the blue-green algae. *Bact. Rev.* **3**, 148-165.
- FORREST (H.S.), Van BAALEN et MYERS (J.), 1957. — Occurrence of pteridines in a blue-green alga. *Science* **125**, 699.
- FORTI (A.), 1907. — Sylloge Myxophycearum. In de Toni « Sylloge Algarum », **5**, 380.
- FRANCE (R.), 1921. — Das Edaphon. Stuttgart.

- FRITSCH (F.E.), 1922. — I. The moisture relations of terrestrial algae. *Ann. Bot. London*, **36**, Ser. 1, 1-20.
- FRITSCH (F.E.), 1922. — II. The terrestrial algae. *J. of Ecology*, **10**, 220.
- FRITSCH (F.E.), 1936. The role of the terrestrial algae in nature. *Essays in Geobotany*, Univ. of California, 195-217.
- FRITSCH (F.E.), 1948. The structure and reproduction of the algae. Cambridge Univ. Press.
- FUJIWARA (T.) et AKABORI (S.), 1954. α ε diaminopimelic acid in *Chlorella ellipsoidea*. *J. Chem. Soc. Japan*, **75**, 990-993.
- GEITLER (L.), 1932. — Cyanophyceae. In *Rabenhorst's Kryptogamenflora*, **14**.
- GERLOFF (G.C.), FITZGERALD (G.P.) et SKOOG (F.), 1950. — The isolation, purification and culture of blue-green algae. *Amer. J. Bot.* **37**, 216.
- GISTL (R.), 1932. Zur Kenntnis der Erdalgen. *Arch. f. Mikrobiol.* **3**, 624-649.
- GLADE (R.), 1914. — Zur Kenntnis der Gattung *Cylindrospermum*. *Beitr. Biol. der Pflanzen*, **12**, 295.
- HARDER (R.), 1917. — Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Cyanophyceen, hauptsächlich dem endophytischen *Nostoc punctiforme*. *Z. Bot.* **9**, 145-242.
- HARDER (R.) et OPPERMAN (A.), 1953. — Über antibiotische Stoffe bei den Grünalgen *Stichococcus bacillaris* und *Protosiphon botryoides*. *Arch. f. Mikrobiol.*, **19**, 398-401.
- HOLM-HANSEN (O.), GERLOFF (G.C.) et SKOOG (F.), 1954. — Cobalt as an essential element for blue-green algae. *Physiol. Plantar.* **7**, 665-675.
- HOUGH (L.), JONES (J.K.) et WADMAN (W.H.), 1952. — An investigation of the polysaccharide components of certain freshwater algae. *J. Chem. Soc.* **13**, 3352-3359.
- JAAG (O.), 1945. — Experimentelle Untersuchungen über die Variabilität einer Blaualge unter dem Einfluss verschieden starker Belichtung. *Verh. Naturforsch. Basel*, **56**, 28-40.
- JANCZEWSKI (E.), 1874. — Observations sur la reproduction de quelques Nostochacées. *Ann. Sc. Nat. Série 5, Bot.*, **19**, 119-130.
- JOHN (R.P.), 1942. — An ecological and taxonomic study of the algae of British soils. *Ann. Bot. London*, N. 5, **6**, 323-349.
- JORGENSEN (E.G.), 1956. — Growth inhibiting substances formed by algae. *Physiol. Plantar.* **9**, 712-726.
- KLEIN (G.), 1915. — Zur Chemie der Zellhaut der Cyanophyceen. *Sitzungsber. Kais. Akad. Wiss. Wien, Abt. I*, **124**, 529-544.
- KLOSA (J.), 1949. — Ein neues Antibiotikum aus Grünalgen. *Zeitschr. f. Naturf.* **4 b**, **3**, 187.
- KOPETZKY-RECHTER (O.), 1931. — Die Zersetzungskörperchen der Desmidiaceenzelle. *Arch. f. Protistenkunde*, **75**, 270.
- KRATZ (W.) et MYERS (J.), 1955. — Nutrition and growth of several blue-green algae. *Amer. J. Bot.* **42**, 282-287.
- KROGH (A.), LANGE (E.) et SMITH (W.), 1930. — On the organic matter given off by algae. *Biochem. Jour.* **24** (2), 1666-1671.

- KYLIN (H.), 1943. — Zur Biochemie der Cyanophyceen. *Kgl. Fysio graf. Sällskap.* Lund. Fôhr, **13**, (7), 1-14.
- LAZAROFF (N.), 1955. — The demonstration of a developmental cycle in the growth of a blue-green alga. *Bact. Proc. U.S.A.*, 59-60.
- LEFEVRE (M.), 1935. — Sur la signification des corpuscules trépidants chez les Desmidiées. *Vol. Tricentenaire du Museum*, Paris.
- LEFEVRE (M.), 1936. — Technique des cultures cloniques de Desmidiées. *Ann. Sc. Nat. Bot.* Série 10, **19**.
- LEFEVRE (M.), JAKOB (H.) et NISBET (M.), 1952. — Auto- et hétéro-antagonisme chez les Algues d'eau douce. *Ann. Stat. Centrale Hydrobiol. Appliquée*, **4**.
- LEFORT (M.) et SIGNOL (M.), 1955. — Méthode rapide de séparation des principaux pigments foliaires par chromatographie sur papier. *Rev. Gén. Bot.*, **62**, 683.
- LESAGE (I.), 1945. — Phycothérapie et phycéine. *Bull. Acad. Vét. France*, **18**, 272.
- LEWIN (R.A.), 1956. — Extracellular polysaccharides of green algae. *Canad. J. Microbiol.* **2**, 665-672.
- LOUW (P.G.J.), 1950. — The active constituent of the poisonous algae : *Microcystis toxica* Stephens. *South Afr. Ind. Chem.* 62-66.
- LYNGBIE (G.), 1819. — Tentamen Hydrophytologiae danicae.
- MAERTENS (H.), 1914. — Das Wachstum von Blaualgen in mineralischen Nährlösungen. *Beitr. Biol. der Pflanzen*, **12**, 439-496.
- MAGDEBURG (P.), 1933. — Organogene Kalkkonkretionen in Höhlen. *Sitzungsber. der Naturf. Ges. Leipzig*, **59**.
- MCVEIGH (I.) et BROWN (W.H.), 1954. — In-vitro growth of *Chlamydomonas chlamydogama* Bold and *Haematococcus pluvialis* Flotow, in mixed cultures. *Bull. Torrey Bot. Club*, **81**, 218-233.
- MORTON (A.G.) et BROAD-BENT (D.), 1955. — The formation of extracellular nitrogen compounds by fungi. *J. Gen. Microbiol.* **12**, 248-258.
- MYERS (J.), 1951. — Physiology of the algae. *Ann. Rev. of Microbiol.* **5**, 157.
- PASCHER (A.), 1925-1930. — Die Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz.
- PRATT (R.), 1940. — Studies on *Chlorella vulgaris*. *Amer. H. Bot.* **27**, N° 1, 52-56.
- PRATT (R.), 1942. — Studies on *Chlorella vulgaris*. *Amer. J. Bot.* **29**, N° 2, 142-148.
- PRATT (R.), 1943. — *Amer. J. Bot.* **30**, N° 8, 626-629.
- PRATT (R.), 1944. — *Amer. J. Bot.*, **31**, N° 7, 418-421.
- PRATT (R.), 1945. — *Amer. J. Bot.* **32**, N° 7, 405-408.
- PRATT (R.), 1948. — *Amer. J. Bot.* **35**, N° 9, 634-637.
- PRATT (R.) et FONG (J.), 1940. — Studies on *Chlorella vulgaris*. *Amer. J. Bot.* **27**, N° 6, 431-436.
- PRATT (R.), DANIELS (T.C.) et EILER (J.J.), 1944. — Chlorellin an antibacterial substance from *Chlorella*. *Science*, **99**, 351-352.

- PRINGSHEIM (E.G.), 1913. — Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen: III. Zur Physiologie der Schizophyceen. *Beitr. Biol. der Pflanzen*, **12**, 49-108.
- PRINGSHEIM (E.G.), 1946. — Pure culture of algae. Cambridge Univ. Press.
- PRINGSHEIM (E.G.), 1952. — Experimental elimination of chromatophores and eye-spot in *Euglena gracilis*. *New Phytol.* **51**, N° 1, 65-76.
- PROCTOR (V.W.), 1957. — Studies of algal antibiosis using *Haematococcus* and *Chlamydomonas*. *Limnology and Oceanography*, **2**, N° 2.
- RICE (T.R.), 1954. — Biotic influences affecting population growth of planctonic algae. *Fishery Bull. U.S., Fish and Wildlife Serv.* **54** (87), 227-245.
- ROBBINS (W.W.), 1912. — Algae in some Colorado soils. *Colorado Agric. Exp. Sta., Bull.* 184.
- SCHELLHORN (von M.), 1936. — Zur Ökologie und Biologie der Erdalgen. *Naturw. und Landw.* **12**, 1-52.
- SCHOENTAL (R.), 1941. — The nature of the antibacterial agents present in *Pseudomonas pyocyanea*. *Brit. J. of Exp. Pathol.* **22**, N° 3.
- SCHRAMM (J.R.), 1914. — Some pure culture methods in the algae. *Ann. Miss. Bot. Garden.* **1**, 23.
- SHILO (M.) et ASCHNER (M.), 1953. — Factors governing toxicity of cultures containing the Phytoflagellate *Prymnesium parvum* (Carter). *J. Gen. Microbiol.* **8**, 333-343.
- SMITH (G.M.), 1933. — The freshwater algae of the United States. *Mc Graw Hill Book Co., London*.
- SPOEHR (H.A.), SMITH (J.H.C.), STRAIN (M.H.) et MILNER (M.W.), 1949. — Fatty acid antibacterials from plants. *Carnegie Inst. Wash. Publ.* N° 586.
- STOKES (J.L.), 1940. — The influence of environmental factors upon the development of algae and other microorganisms in soil. *Soil Science*, **3**, 49.
- TAYLOR (C.B.), 1947. — Bacteriology of water. *Nature*, **160**, 4066.
- THURET (G.), 1857. — Note sur la reproduction du *Nostoc verrucosum*. *Ann. Sc. Nat.* **2**, 319, et *Mém. Soc. Hist. Nat. Cherbourg*, **5**, 1-3.
- TOLBERT (N.E.), 1955. — *Federation Proc.* **14**, 292.
- TREUB (F.), 1888. — Notice sur la nouvelle flore du Krakatau. *Ann. Jard. Bot. Buitenzorg*, **7**, 213-223.
- VAUCHER (J.P.), 1903. — Histoire des Conferves d'eau douce. Genève.
- VAURA (J.), 1956. — Ist der Photorezeptor ein unabhängiges Organell der Eugleniden. *Arch. f. Mikrobiol.* **25**, N° 3, 223-225.
- VISCHER (W.), 1950. — Symposium über die Biologie des Bodens im Schweizerischen Nationalpark. Botanische Untersuchungen. *Ber. d. Schweiz. Naturf. Ges.* **130**, 86-92.
- WAKSMAN (S.A.), 1948. — Antagonismes microbiens et substances antibiotiques. Paris, *Ed. Ens. Sup.*
- WALP (L.) et SHOPBACH (R.), 1942. — Influence of the pH on the proliferation of *Nostoc muscorum*. *Growth* **6**, 33-37.

- WATANABE (A.), 1951. — Production in cultural solution of some amino-acids by atmospheric nitrogen fixing algae. *Arch. Biochem. Biophys.* **34**, 50.
- WEINTRAUT (Th.), 1943. — Zur Kenntnis der Erdalgen. *Sitzungsber. Bayer. Akad. Wiss. Munchen*, 93-125.
- WEST (W.), 1912. — A. monograph of the British Desmidiaceae. *Edition of the Ray Society*, London, **1** à **5**.
- WORK (E.) et DEWAX (D.L.), 1943. — The distribution of α - ϵ -diaminopimelic acid among various microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* **9**, 394-409.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction.

CHAPITRE PREMIER : Recherches sur les compatibilités, antagonismes et antibioses entre les Algues du sol. Substances issues du métabolisme de quelques-unes de ces Algues.

I. — Etat actuel des connaissances.....	7
II. — Mise en évidence d'interactions entre espèces algales du sol...	10
A) Interactions dans les cultures sur gélose	11
B) Action de filtrats de cultures unialgales de différentes espèces d'Algues du sol sur d'autres espèces.....	11
III. — Action des filtrats de cultures de <i>Nostoc muscorum</i>	11
A) Sur d'autres Algues	11
B) Sur la microflore bactérienne d'échantillons d'un sol....	14

CHAPITRE II : Etude spéciale de l'activité antibiotique d'une des Algues du sol : *Nostoc muscorum*.

I. — Les cultures de <i>Nostoc muscorum</i> . Méthodes de culture. Isolement en culture bactériologiquement pure.....	15
II. — Description du <i>Nostoc muscorum</i> et étude de son cycle de développement	17
III. — Utilisation des filtrats de culture.....	19

CHAPITRE III : Conditions de production de la substance antibiotique du *Nostoc muscorum* : « La Muscorine ».

I. — Influence de divers facteurs extérieurs.....	20
A) Influence de la composition du milieu de culture.....	20
a) Composition en éléments minéraux.	20
b) Addition d'éléments organiques.....	22
c) Autres milieux de culture.....	22
d) Modifications de l'aspect des cultures et de la morphologie des cellules dans les différents milieux.....	26
B) Influence de l'aération	26
C) Influence de l'intensité lumineuse reçue par les cultures..	27
D) Influence de la température	27
II. — Influence de facteurs internes.	29
A) Age des cultures servant à l'inoculation.	29
B) Cultures productrices ou non de « muscorine ».....	30

CHAPITRE IV : Etude chimique de la muscorine.

I. — Extraction et purification.....	31
A) Par solvants.....	31
a) Solubilité dans l'alcool.....	31
b) Solubilité dans l'éther éthylique	31
B) Par chromatographie.	33
a) Chromatographie sur papier.....	33
b) Chromatographie sur colonnes	34
c) Rendements obtenus par les divers procédés d'extraction.	35
II. — Caractéristiques physiques et chimiques de la muscorine.....	36
A) Caractères physiques.	36
B) Caractères chimiques	37

CHAPITRE V : Activité biologique de la « muscorine ».

I. — Dosage biologique.	42
A) Choix d'un organisme test	42
B) Technique du dosage	43
C) Etude de l'influence de divers facteurs sur le dosage.	43
a) Concentration en éléments nutritifs.	43
b) Variation du temps de contact du <i>Cosmarium</i> avec la « muscorine »	44
c) Influence de la lumière	48

II. — Action sur <i>Cosmarium Lundellii</i> .	49
A) Sur la vitesse de multiplication.	49
a) Filtrats bruts	49
b) Produit purifié	49
B) Sur la cytologie de la cellule pendant le contact avec la muscorine	54
III. — Action sur d'autres Algues.	55
A) Sur <i>Nostoc muscorum</i> .	56
B) Sur <i>Phormidium uncinatum</i>	56
C) Sur <i>Euglena mutabilis</i> .	56
IV. — Action sur une Levure de boulangerie : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
V. — Discussion.	62
Résumé et conclusions.	63
Bibliographie	67

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Symbiose entre algues et animaux.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 24 avril 1958

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Université de Paris,

Jean SARRAILH.

EXPLICATION DE LA PLANCHE I

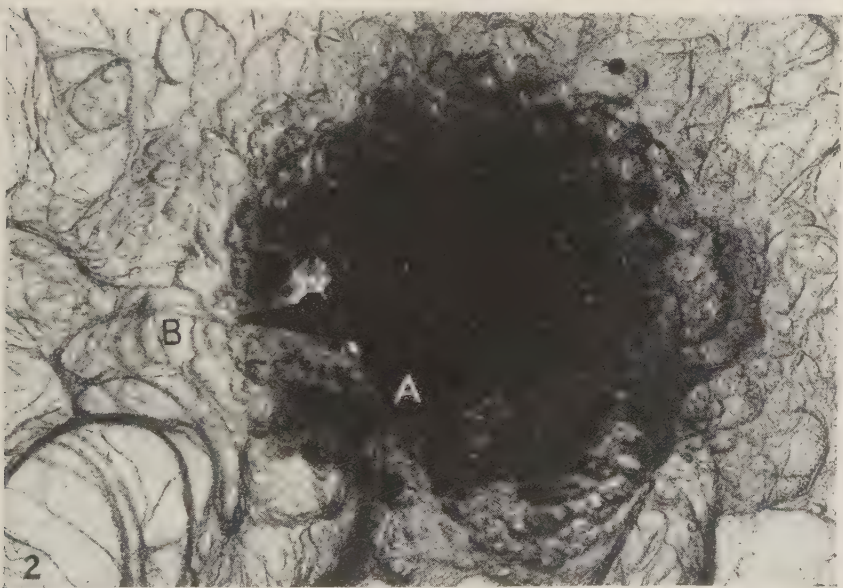
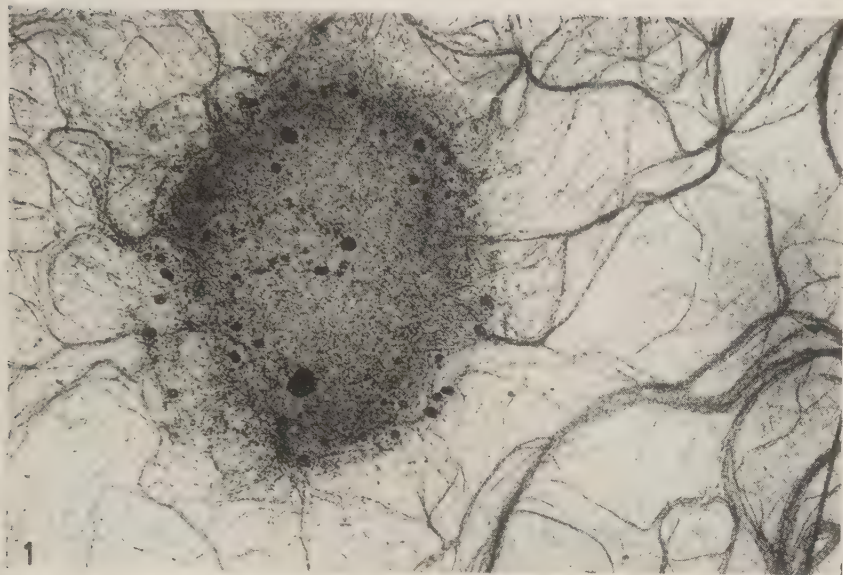
Espèces compatibles entre elles en cultures sur gélose.

Fig. 1. — *Nostoc minutum* et *Phormidium autumnale*.

Les 2 espèces croissent ensemble et s'imbriquent l'une dans l'autre.

Fig. 2. — *Nostoc muscorum* (A) et *Phormidium autumnale* (B).

Les 2 espèces croissent ensemble.



Mlle JAKOB phot.

GRIMARD, sc.

Nostoc muscorum et *Phormidium autumnale*.

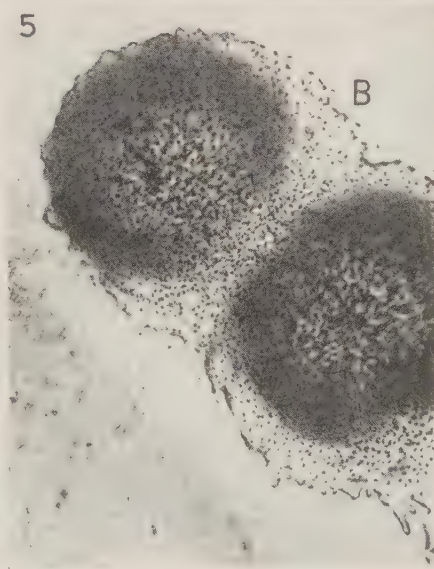
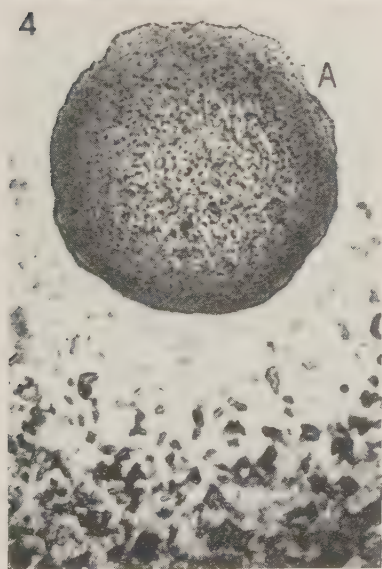
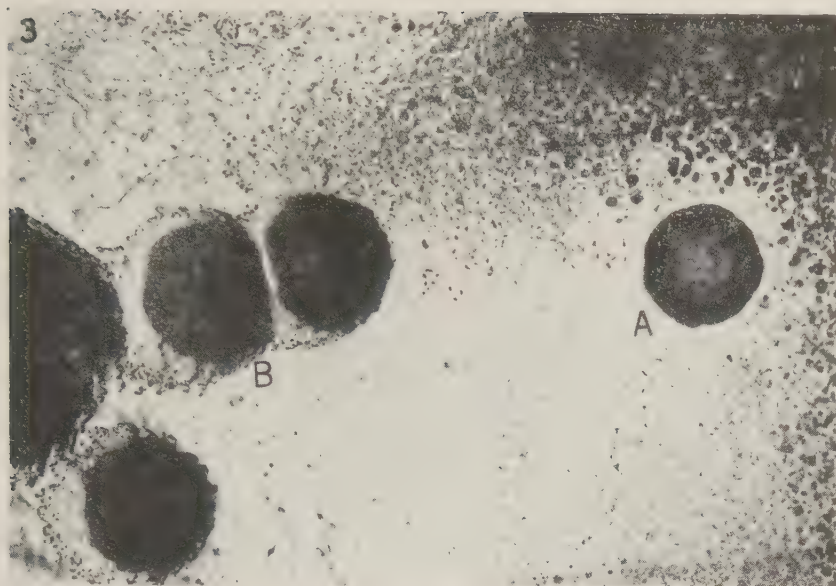
EXPLICATION DE LA PLANCHE II

Inhibition de la croissance de colonies de *Cosmarium Lundellii* au voisinage d'une culture de *Nostoc muscorum* en cultures sur gélose.

Fig. 3. — Aspect des colonies de *Cosmarium* A et B en fonction de leur éloignement de la culture de *Nostoc* ($\times 3$).

Fig. 4. — Agrandissement de la zone A, colonie proche du *Nostoc*. L'examen microscopique des cellules du *Cosmarium* permet d'observer qu'elles sont mortes.

Fig. 5. — Agrandissement de la zone B, colonies éloignées du *Nostoc*. Les cellules se multiplient encore activement tout autour du centre des colonies du *Cosmarium*.



Mlle JAKOB, phot.

GRIMARD, sc.

Cosmarium et *Nostoc*.

EXPLICATION DE LA PLANCHE III

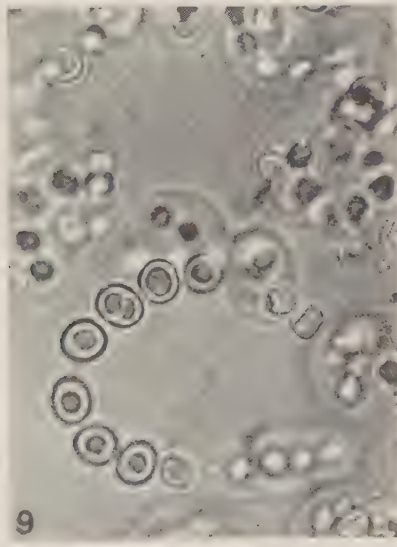
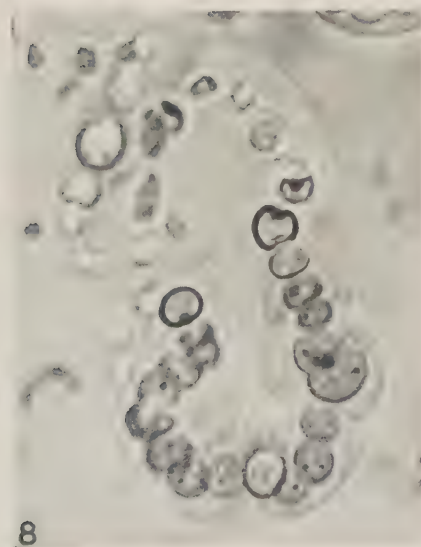
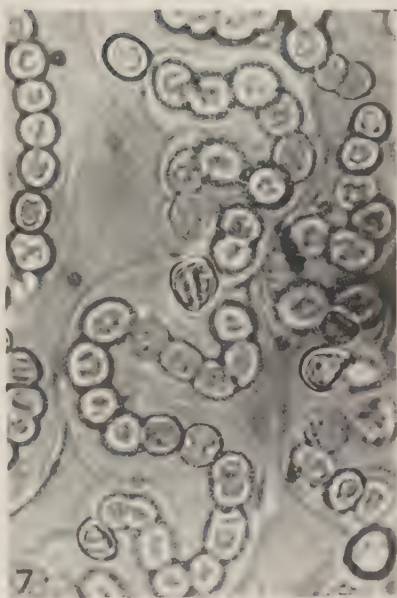
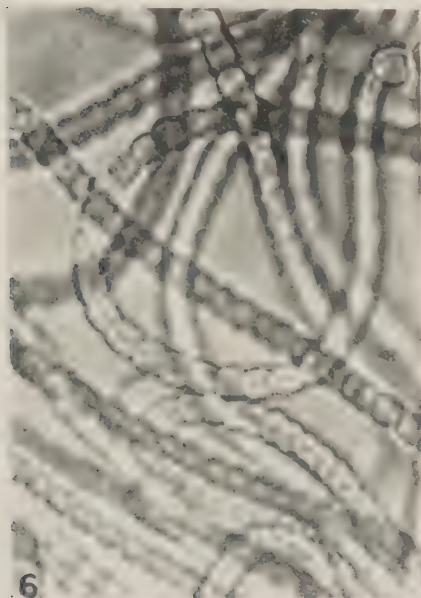
Cycle du développement de *Nostoc muscorum*.

Fig. 6. — Filaments jeunes (culture âgée de 8 jours). Filaments libres, mobiles, dépourvus de gangue. Présence d'hétérocystes intercalaires.

Fig. 7. — Culture âgée de 5 semaines. La gangue mucilagineuse est épaisse. Les hétérocystes sont nombreux. Quelques cellules commencent à se différencier en akinètes.

Fig. 8. — Culture âgée de 6 semaines. La gangue est très épaisse.

Fig. 9. — Chaîne d'akinètes d'une culture âgée de 4 mois. L'un des akinètes (A) est divisé en deux. La division a eu lieu dans un plan perpendiculaire au plan de division des cellules du filament.



Mlle JAKOV, phot.

GRIMARD, sc.

Nostoc muscorum.

EXPLICATION DE LA PLANCHE IV

Modifications cytologiques de la cellule de *Cosmarium Lundellii* après des temps de contact variant de 5 à 48 heures avec la muscorine. Les doses utilisées exercent un effet létal après 48 heures.

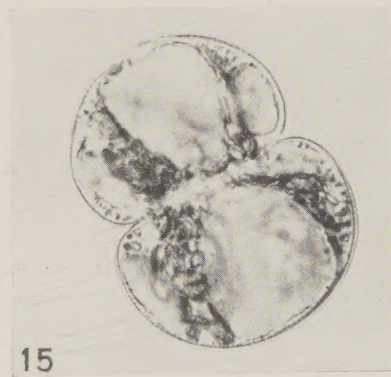
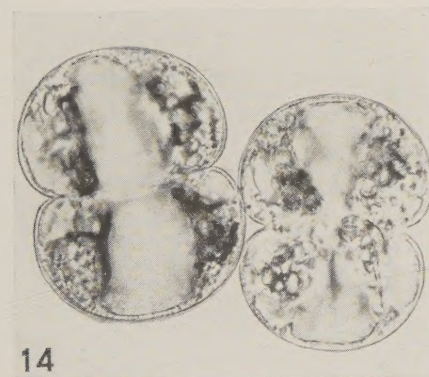
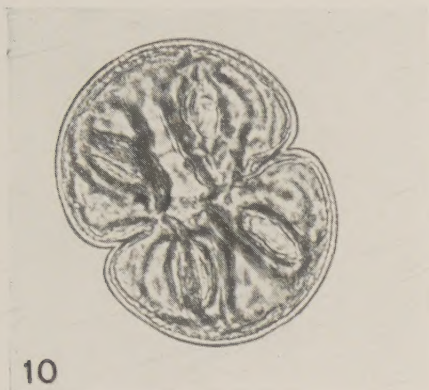
Fig. 10. — Témoin présentant des chloroplastes tapisant la totalité de la cellule et 4 gros pyrénoides bien apparents.

Fig. 11. — Après 5 heures de contact : début de vacuolisation.

Fig. 12. — Après 24 heures de contact : vacuolisation importante et rétraction des chloroplastes.

Fig. 13. — Après 24 heures de contact : accumulation de corpuscules trépidants.

Fig. 14 et 15. — Après 48 heures de contact : rétraction complète des chloroplastes. Forte vacuolisation. Disparition des corpuscules trépidants. La cellule est morte.



Mlle JAKOB, phot.

GRIMARD, sc.

Cosmarium Lundellii.

